

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
Departamento de Química Analítica



**TESIS DOCTORAL**

**Diseño, síntesis y evaluación de nuevos nanosistemas para su  
aplicación en biomedicina**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Sandra Montalvo Quirós**

**Directores**

**José L. Luque García**  
**Blanca González Ortiz**  
**Rafael C. Prados Rosales**

**Madrid 2019**



Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Ciencias Químicas

# DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS NANOSISTEMAS PARA SU APLICACIÓN EN BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

Sandra Montalvo Quirós

Directores:

José L. Luque García

Blanca González Ortiz

Rafael C. Prados Rosales

Madrid, 2018





# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



## TESIS DOCTORAL

**DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS NANOSISTEMAS PARA SU  
APLICACIÓN EN BIOMEDICINA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Sandra Montalvo Quirós**

Directores

José L. Luque García  
Blanca González Ortiz  
Rafael C. Prados Rosales

**Madrid, 2018**





**D. JOSE L. LUQUE GARCÍA**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

**Da. BLANCA GONZÁLEZ ORTIZ**, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS (UNIDAD DOCENTE DE QUÍMICA INORGÁNICA Y BIOINORGÁNICA) DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, y

**D. RAFAEL C. PRADOS ROSALES**, INVESTIGADOR RAMON Y CAJAL EN CENTRO DE INVESTIGACIONES COOPERATIVAS (CICBIOGUNE) DE VIZCAYA; PROFESOR AYUDANTE DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DEL ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE DE NEW YORK,

**HACEN CONSTAR QUE:**

El presente trabajo, titulado “Diseño, síntesis y evaluación de nuevos nanosistemas para su aplicación en biomedicina”, ha sido realizado bajo nuestra supervisión, por la Graduada D<sup>a</sup>. Sandra Montalvo Quirós, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 14 de Junio de 2018



Fdo.: José L. Luque García



Fdo.: Blanca González Ortiz



Fdo.: Rafael C. Prados Rosales



## **Agradecimientos**

El camino que he recorrido para llegar a este punto ha estado repleto de conocimientos, derrotas, éxitos y momentos que merece la pena recordar. Con estas líneas quiero mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han formado parte de esta etapa de aprendizaje. Porque para mí, la elaboración de esta tesis me ha enseñado mucho, no solo a nivel científico sino también humano, sobre todo a conseguir progresar y ser capaz de llegar a cumplir las metas propuestas.

En primer lugar, agradezco a las Profesoras Carmen Cámara y María Vallet por acogerme para iniciar mi camino en la investigación. Y por extensión al departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas y al departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas (Unidad docente de Química Inorgánica y Bioinorgánica), así como a los directores de los mismos la Profesora Mari Cruz Moreno Bondi y el Doctor Juan Carlos Doadrio.

Agradecer en especial a mis directores, el Doctor Jose L. Luque que me permitió realizar mi trabajo fin de máster en el campo de la bioanalítica y posteriormente confió en mí para llevar a cabo la tesis doctoral, a la Doctora Blanca González que me adentro en el mundo de las nanopartículas de sílice mesoporosa, y al Doctor Rafael Prados que siempre puso su sabiduría en el campo de las bacterias y en especial de la tuberculosis. Agradezco vuestra confianza en mí y vuestra disposición para hacerme crecer tanto a nivel profesional como personal. Naturalmente no me puedo olvidar del resto de componentes de los grupos, que de alguna u otra manera han formado parte de esta etapa: Milagros, Mariluz, Yolanda, Teresa, Rian, Jon, M<sup>a</sup> Eugenia, Noelia, Conchita, M<sup>a</sup> Antonia, Lola y Estefanía, así como Antonio, Daniel, Montse, Isabel, África, Ana, Sandra, Vicky, Juan, Jesús, Rafa, Alejandro, Miguel, entre otros muchos.

Gracias a todos los técnicos de los centros de apoyo a la investigación que han participado en gran medida en esta Tesis.

Pero he de admitir que todo esto hubiera sido muy diferente sin los doctorandos con los que al final he compartido infinidad de horas y momentos tanto de trabajo como de risas, congresos, fiestas, cañas y muchos otros más. Por eso quiero agradecerles a todos ellos. A Pablo, que además de ser un gran compañero y ayudarme en cada momento, de manera incondicional, es un gran amigo que me llevo para toda la vida. A Sonia, gracias por todos los buenos momentos y por confiar en mí en los inicios. A María, por cada risa compartida y sobre todo por enseñarme que cuando algo no sale como esperabas en el laboratorio pintarse los labios ayuda y mucho ;). Noe gracias por ser tan cariñosa y por cuidar de tu gente. Irene, por las historias y esas clases de sevillanas. Ana, nuestra asturiana favorita, gracias por ser la “mami” de todos y por compartir toda tu sabiduría incondicionalmente. Mari, la de horas y risas compartidas en el laboratorio y otras tantas fuera de él, gracias por esos viajes y esas fiestas, por aprenderte las sevillanas y bailarlas hasta el amanecer en Córdoba. Elena y Laura, con vosotras las horas de trabajo estaban siempre llenas de un toque de humor con vuestras “peleas”, gracias por esas risas. Bea, gracias por ser tan buena persona y tener tan buena disposición frente a todo. Gus, por los momentos de locura sin los que la etapa final se habría hecho cuesta arriba. A las nuevas incorporaciones David, Ester, Emma... porque, aunque no hayamos compartido mucho tiempo siempre me llevaré buenos recuerdos. A todos los componentes de QBA, Estefanía, Espadas, Carlos, Guille, Andrés, Raúl, Héctor....

Gracias por compartir y hacer llevaderas las horas de laboratorio y por esos momentos post-congresos o incluso esas “rivalidades” en los juegos de scape room.

A todos los compañeros de la Facultad de Farmacia. Nati, porque ha sido mi punto de apoyo desde el principio y agradezco haber podido compartir esta etapa contigo. Rebeca, porque siempre nos tendremos las mismas pasiones y películas en la cabeza. Rocío por su ayuda y su buena disposición, el Maño por sus tonterías que acababan en risas, Gonzalo por las conversaciones y las bromas, Sergio por la ayuda y su amabilidad constante, Patri por su simpatía que se transmite siempre....

No me puedo olvidar de los químicos y el inorgánico que han supuesto un grupo especial de amigos. Diego, porque nunca podremos dejar de reírnos con tus torpezas, aunque en el fondo tengas un gran corazón. Sonia, porque sobrevivir con todos estos cerca es una locura y tú siempre has estado al pie del cañón para cualquier cosa. Jacobo, porque con tus historias y tus fricadas nos das un toque especial. Mac, aunque no hayamos coincidido siempre, tengo la sensación de que eres todo bondad. Nacho, porque aun con tu TOC siempre tienes algo que ofrecernos.

A mis flores, porque aparecieron en mi vida en el momento menos pensado, pero sé que se van a quedar para siempre. Marta porque eres mi amiga, mi confidente y siempre estas cuando te necesito. Laura porque trabajar contigo se hizo muy sencillo, pero sobre todo porque todo eso fue traspasado y me has demostrado ser una gran amiga. Mil gracias por todos los momentos juntas y por los que nos quedan por venir. Mariu, por las horas de almuerzo entre risas y conversaciones de zapatillas.

Finalmente, gracias de corazón a toda mi familia por su apoyo incondicional y su confianza en mí. En especial a mis padres, Pedro y Esther porque siempre me han dado la fuerza para continuar y han mostrado la confianza en mí que en ocasiones yo he dudado tener. Lorena, porque para mí eres como de la familia (y ahora también mi Carlota), gracias porque sé que aún en la distancia te tengo a mi lado. Por último, a Vicente por acompañarme en el día a día, en los momentos malos y en los buenos y por ver siempre mi lado bueno y mis capacidades.

La elaboración de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una beca para la formación de profesorado universitario (FPU13-00723) dentro del programa estatal de promoción del talento y su empleabilidad del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

El presente trabajo ha sido desarrollado en los siguientes departamentos:

- Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) dentro de las líneas de investigación del *Grupo de Investigación Determinación de Trazas, Especiación y Proteómica (TrEP)* y de sus proyectos de investigación CTQ2014-55711-R y CTQ2017-85673-R del Ministerio de Economía y Competitividad.
- Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas (Unidad Docente de Química Inorgánica y Bioinorgánica) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) dentro de las líneas de investigación del *Grupo de Investigación Biomateriales Inteligentes (GIBI-UCM)* y de sus proyectos de investigación VERDI (ERC-2015-AdG Proposal No. 694160, European Research Council), MAT2013-43299-R, MAT2015-64831-R y MAT2016-75611-R (AEI/FEDER UE) del Ministerio de Economía y Competitividad.
- Centro de investigación en Biociencias CIC BIOGUNE dentro de los proyectos NIH-R21 del National Institutes of Health (NIH) y SAF2016-77433-R del Ministerio de Economía y Competitividad.



## Índice de materiales

---

<b>MSNs</b>	Nanopartículas de sílice mesoporosa.
<b>MSNs-CTAB</b>	Nanopartículas de sílice mesoporosa con surfactante CTAB en el interior de los poros.
<b>MSNs-NH-NH<sub>2</sub></b>	Nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con grupos amino (tanto interna como externamente).
<b>MSNs-COOH<sub>ext</sub></b>	Nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas en la superficie externa con grupos ácidos.
<b>MSNs-Proteína</b>	Nanopartículas de sílice mesoporosa decoradas covalentemente con proteína sobre la superficie externa previamente funcionalizada con grupos ácidos.
<b>MSNs-BSA</b>	Nanopartículas de sílice mesoporosa decoradas covalentemente con albumina de suero bovino sobre la superficie externa previamente funcionalizada con grupos ácidos.
<b>MSNs-Tf</b>	Nanopartículas de sílice mesoporosa decoradas covalentemente con transferrina sobre la superficie externa previamente funcionalizada con grupos ácidos.
<b>MSNs-Ag85B</b>	Nanopartículas de sílice mesoporosa decoradas covalentemente con antígeno 85 B (Mtb) sobre la superficie externa previamente funcionalizada con grupos ácidos.
<b>MSNs-LprG</b>	Nanopartículas de sílice mesoporosa decoradas covalentemente con lipoproteína G (Mtb) sobre la superficie externa previamente funcionalizada con grupos ácidos.
<b>MSNs-LprA</b>	Nanopartículas de sílice mesoporosa decoradas covalentemente con lipoproteína A (Mtb) sobre la superficie externa previamente funcionalizada con grupos ácidos.
<b>MSNs-AgNPs<sub>ext</sub></b>	Nanopartículas de sílice mesoporosa decoradas con nanopartículas de plata (AgNPs) en el exterior.
<b>MSNs-AgNPs</b>	Nanopartículas de sílice mesoporosa con nanopartículas de plata (AgNPs).
<b>MSNs-AgBrNPs</b>	Nanopartículas de sílice mesoporosa con nanopartículas de bromuro de plata (AgBrNPs).
<b>Ag@MSNs</b>	Nanopartículas tipo “núcleo@corteza” con núcleo de AgNPs recubiertas de sílice mesoporosa.

---





## Lista de abreviaturas

---

<i>Ab</i>	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>Ag</i>	Antígeno
Ag85B	Antígeno 85B de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
AgBrNPs	Nanopartículas de bromuro de plata
AgNPs	Nanopartículas de plata
APCs	Células presentadoras de antígenos (del inglés <i>Antigen Presenting Cells</i> )
APTES	(3-aminopropil)triethoxisilano
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Asp	Ácido aspártico
ATP	Trifosfato de adenosina
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Barret-Joyner-Halenda
BSA	Albúmina de suero bovino
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario de cadena simple
CD4	Linfocitos T-4
CD8	Linfocitos T-8
Cdks	Quinasas dependientes de ciclinas
CID	Disociación inducida por colisión
CKI	Inhibidor de quinasas dependientes de ciclina
CLCT	Del inglés <i>Cooperative Liquid Cristal Template</i>
CP-MAS-NMR	Resonancia magnética nuclear con técnica de rotación en el ángulo mágico combinada con polarización cruzada (del inglés <i>Cross Polarization Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance</i> )
CryoEM	Criomicroscopía electrónica
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DC	Células dendríticas
DLS	Dispersión de luz (del inglés <i>Dynamic Light scattering</i> )
DMEM	medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dp	Diámetro de poro
DRX	Difracción de rayos X
dsADN	Ácido desoxirribonucleico de cadena doble
DTA	Análisis térmico diferencial ( del inglés <i>Differential Thermal Analysis</i> )
DTT	1,4-ditiotreitol
EDC×HCl	Hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N-atilcarbodiimida
EDS	Espectroscopia de energía dispersiva
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELISA	del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

---

---

EPR	Efecto de permeabilidad y retención mejoradas
ESI	Ionización por electrospray
ETD	Disociación por transferencia de electrones
EtOH	Etanol
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Isocianato de fluoresceína
FRET	Transferencia de energía de resonancia
FR- $\alpha$	Receptor de ácido fólico
FSC	del inglés forward scatter
GADPH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
Glu	Ácido glutámico
GO	Base de datos Gene Ontology
HaCaT	Línea celular de queratinocitos humanos
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HepG2	Línea celular de hepatocarcinoma humano
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HRP	Peroxidasa de rábado (del inglés <i>horseradish peroxidase</i> )
ICAT	del inglés isotope-coded affinity tags
IL-10	Interleucina 10
INF- $\gamma$	Interferón gamma
IP	Yoduro de propidio
iTRAQ	del inglés Isobaric tags for relative and absolute quantification
LprA	Lipoproteína A
LprG	Lipoproteína G
LPS	Lipopolisacáridos
LTQ	Espectrómetro de masas con trampa lineal en 2D (del inglés <i>Linear Trap Quadrupole</i> )
LTQ-Orbitrap	Espectrómetro de masas híbrido con trampa de iones lineal y orbitrap
Lys	Lisina
MALDI	Ionización/desorción láser asistida por matriz
MAS-NMR	Resonancia magnética nuclear con técnica de rotación en el ángulo mágico (del inglés <i>Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance</i> )
MCM-41	Estructura mesoporosa MCM-41 ( del inglés <i>Mobil Composition of Matter n° 41</i> )
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad II
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MMP-9	Metaloproteinasa 9
MSNs	Nanopartículas de sílice mesoporosa
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	Complejo de micobacterias <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio
MV	Vesículas derivadas de membrana
NC	Nitrocelulosa
NPs	Nanopartículas
OD	Densidad óptica

---

---

OMS	Organización Mundial de la Salud
P/P <sub>0</sub>	Presión relativa
PA	Poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	Tampón fosfato salino con 0.05% de Tween-20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDI	Índice de polidispersidad
PEG	Polietilenglicol
PI	Proteínas inmunomoduladoras
pI	Punto isoeléctrico
PLG	Ácido poliglicólico
PLGA	Poli (ácido-L(+)-láctico-co-glicólico)
PS	Fosfatidilserina
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
Q	Espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo
QIT	Trampa de iones en 3D (del inglés <i>Quadrupole Ion Trap</i> )
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
QqQ	Espectrómetro de masas triple cuadrupolo
Q-TOF	Espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo
RAW264.7	Línea celular de macrófagos de ratón
RES	Sistema reticuloendotelial
RNasa	Enzima ribonucleasa
RNIs	Intermediarios reactivos del nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSD	Desviación estándar relativa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transptasa inversa
SBA-15	Estructura de sílice mesoporosa SBA 15 (del inglés <i>Santa Barbara Amorphous-15</i> )
S <sub>BET</sub>	Superficie específica calculada mediante el método BET
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SEM	Microscopía electrónica de barrido (del inglés <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
SERS	Espectroscopia Raman de superficie mejorada
siARN	ARN de silenciamiento
SILAC	Marcaje isotópico estable con aminoácidos en cultivos celulares (del inglés <i>Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture</i> )
ssADN	Ácido desoxiribonucleico de cadena simple
SSC	del inglés side scatter
TB	Tuberculosis
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (del inglés <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
TEOS	Tetraetilortosilicato
TESPSA	Anhídrido 3-(triethoxysilil)propilsuccínico
Tf	Transferrina
TfR	Receptor de transferrina

---

---

TGA	Análisis termogravimétrico (del inglés <i>Thermogravimetric Analysis</i> )
Th1	Linfocitos T helper 1
Th17	Linfocitos T helper 17
Th2	Linfocitos T helper 2
TiO <sub>2</sub> -NPs	Nanopartículas de dióxido de titanio
TLCT	Del inglés True Liquid Cristal Template
TLR2	Receptor de tipo Toll 2
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral
TOF	Tiempo de vuelo
TOF-TOF	Espectrómetro de masas con dos analizadores de tiempo de vuelo
TSD	[3-(2-aminoetilamino)propil]trimetoxisilano
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
V <sub>p</sub>	Volumen de poro
$\zeta$ -potencial	Potencial zeta

---

# ÍNDICE

---



# Índice de contenidos

Índice de figuras -----	VII
Índice de tablas -----	XIX
RESUMEN -----	1
SUMMARY -----	7
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN -----	13
<b>I.1. NANOMEDICINA PARA EL DESARROLLO DE NUEVAS VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS</b> -----	<b>18</b>
I.1.a. Tuberculosis: infección, progresión, tratamientos y vacunas -----	18
I.1.b. Vesículas secretadas por los patógenos y su interés en el desarrollo de vacunas--	24
I.1.c. Desarrollo de nuevas vacunas basadas en nanotecnología -----	25
I.1.d. Aplicaciones bactericidas y antimicrobianas de nanopartículas basadas en plata-	29
<b>I.2. NANOMEDICINA PARA EL DESARROLLO DE TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER</b> -----	<b>30</b>
I.2.a. Características de las células cancerosas -----	30
I.2.b. Tratamientos contra el cáncer: nuevas terapias basadas en nanopartículas -----	31
CAPÍTULO II. OBJETIVOS -----	41
CAPÍTULO III. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE NANOMATERIALES BASADOS EN SÍLICE MESOPOROSA -----	45
<b>III.1. MATERIALES Y MÉTODOS</b> -----	<b>49</b>
III.1.a. Síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosa ( <b>MSNs</b> )-----	49
III.1.b. Nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con grupos amino ( <b>MSNs-NH-NH<sub>2</sub></b> ) -----	49
III.1.c. Nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con grupos ácido carboxílico en la superficie externa ( <b>MSNs-COOH<sub>ext</sub></b> )-----	50
III.1.d. Nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas covalentemente con proteínas-----	50
III.1.e. Nucleación de nanopartículas de plata sobre MSNs modificadas con grupos amino ( <b>MSNs-AgNPs</b> )-----	51



III.1.f. Nucleación de nanopartículas de AgBr en MSNs modificadas ( <b>MSNs-AgBrNPs</b> )-	52
III.1.g. Síntesis de nanomateriales núcleo@corteza ( <b>Ag@MSNs</b> ) -----	53
III.1.h. Nucleación de nanopartículas de plata sobre materiales funcionalizados con albumina de suero bovino ( <b>MSNs-BSA-AgNPs</b> )-----	54
III.1.i. Nucleación de nanopartículas de plata sobre materiales funcionalizados con transferrina ( <b>MSNs-Tf-AgNPs</b> )-----	55
<b>III.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----</b>	<b>56</b>
III.2.a. Nanopartículas de sílice mesoporosa ( <b>MSNs</b> ) -----	56
III.2.b. Incorporación de nanopartículas inorgánicas sobre las MSNs -----	61
III.2.b.1. Optimización de síntesis de MSNs con nanopartículas de plata soportadas ( <b>MSNs-AgNPs</b> ).-----	61
III.2.b.2. Optimización de síntesis de MSNs con nanopartículas de bromuro de plata ( <b>MSNs-AgBrNPs</b> ).-----	70
III.2.b.3. Optimización para la obtención de nanopartículas núcleo@corteza ( <b>Ag@MSNs</b> ) -----	74
III.2.b.4. Comparación de las características químicas y estructurales de los distintos materiales de sílice con NPs de Ag. -----	78
III.2.c. Nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con proteínas -----	88
III.2.c.1. MSNs con proteínas para vectorización: BSA y Tf -----	91
III.2.c.2. MSNs con proteínas inmunomoduladoras: Ag85B, LprG y LprA. -----	100
III.2.d. Nanosistemas híbridos proteína-Ag. -----	108
III.2.d.1. Optimización del proceso de nucleación de nanopartículas de plata sobre <b>MSNs-BSA</b> . -----	110
III.2.d.2. Optimización del proceso de nucleación de nanopartículas de plata sobre <b>MSNs-Tf</b> . -----	112
III.2.d.3. Comparación de los materiales que contiene AgNPs y diferentes proteínas (BSA y Tf). -----	115
<b>CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN BIOFUNCIONAL Y APLICACIONES BIOMÉDICAS DE NANOMATERIALES-----</b>	<b>119</b>
<b>IV.1. MATERIALES Y MÉTODOS -----</b>	<b>123</b>

IV.1.a. Cultivos celulares-----	123
IV.1.b. Cultivo bacteriano-----	123
IV.1.c. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)-----	123
IV.1.d. Ensayos de evaluación de viabilidad celular -----	124
IV.1.d.1. Evaluación de viabilidad celular tras el tratamiento con nanopartículas de TiO <sub>2</sub> -----	124
IV.1.d.2. Evaluación de viabilidad celular tras el tratamiento con nanosistemas híbridos proteína-Ag-----	125
IV.1.d.3. Evaluación de viabilidad celular tras el tratamiento con nanosistemas con proteínas inmunomoduladoras-----	125
IV.1.e. Ensayos basados en citometría de flujo -----	125
IV.1.e.1. Evaluación del grado de apoptosis y el patrón del ciclo celular tras la exposición a nanopartículas de TiO <sub>2</sub> -----	125
IV.1.e.2. Evaluación de la internalización de nanosistemas con proteínas y nanosistemas híbridos proteína-Ag. -----	126
IV.1.f. Ensayos basados en microscopia: cambios morfológicos y localización intracelular de nanopartículas.-----	127
IV.1.g. Ensayos de expresión génica: RT-qPCR -----	128
IV.1.h. Ensayos de expresión proteica: Western blot y ELISA -----	130
IV.1.h.1. Ensayo Western blot para la evaluación de la expresión proteica tras la exposición a nanopartículas de TiO <sub>2</sub> -----	130
IV.1.h.2. Ensayo ELISA para evaluar los niveles de citoquinas producidas tras el tratamiento con nanosistemas funcionalizados con proteínas inmunomoduladoras. -----	130
IV.1.i. Evaluación de la expresión diferencial de proteína: SILAC-----	131
IV.1.i.1. Experimento SILAC del lisado total de células expuestas a nanopartículas de TiO <sub>2</sub> -----	131
IV.1.i.2. Experimento SILAC con fraccionamiento de proteínas de membrana de células expuestas a nanopartículas de TiO <sub>2</sub> -----	133
IV.1.i.3. Experimento SILAC con fraccionamiento de proteínas de núcleo de células expuestas al material <b>MSNs-Tf-AgNPs</b> -----	135

<b>IV.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>137</b>
IV.2.a. Estudio comparativo de la capacidad bactericida de materiales con plata para el desarrollo de terapias contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb)	137
IV.2.a.1. Evaluación de la capacidad bactericida in vitro sobre la bacteria <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb)	137
IV.2.a.2. Evaluación de los cambios producidos en la pared bacteriana tras el tratamiento con los nanosistemas	140
IV.2.b. Evaluación de nanosistemas con proteínas inmunomoduladoras para su aplicación como vacunas.	141
IV.2.b.1. Evaluación <i>in vitro</i> de la biocompatibilidad y la capacidad de activación del sistema inmune de los nanosistemas	141
IV.2.c. Estudio de los efectos citotóxicos de las TiO <sub>2</sub> -NPs sobre queratinocitos humanos	145
IV.2.c.1. Caracterización de las TiO <sub>2</sub> -NPs comerciales	145
IV.2.c.2. Viabilidad celular tras la exposición a las NPs	146
IV.2.c.3. Evaluación de los cambios morfológicos tras la exposición a las NPs y localización intracelular de las mismas	149
IV.2.c.4. Estudio del grado de apoptosis y del perfil del ciclo celular tras la exposición a las NPs	151
IV.2.c.5. Análisis de expresión génica y proteica de moléculas claves en la regulación del ciclo celular	153
IV.2.c.6. Estudio de expresión diferencial de proteínas tras la exposición a las nanopartículas	157
IV.2.d. Evaluación de la aplicación de nanosistemas híbridos proteína-Ag en tratamientos contra el cáncer	169
IV.2.d.1. Evaluación de la internalización selectiva de los materiales con proteína de vectorización mediante citometría de flujo	169
IV.2.d.2. Evaluación de la viabilidad celular tras la exposición a los diferentes materiales	171
IV.2.d.3. Estudio de localización celular de los nanomateriales	174

IV.2.d.4. Estudio de expresión diferencial de proteínas tras el tratamiento con los nanosistemas desarrollados-----	176
IV.2.d.5. Análisis de la expresión génica para la validación de los resultados obtenidos mediante la estrategia SILAC-----	182
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES-----</b>	<b>185</b>
<b>CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----</b>	<b>189</b>
<b>ANEXO A. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA Y BIOANALÍTICA-----</b>	<b>221</b>
<b>A.1. Técnicas de caracterización analítica -----</b>	<b>223</b>
<b>A.2. Técnicas bioanalíticas para la evaluación de los nanomateriales -----</b>	<b>228</b>
<b>ANEXO B: APORTACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS-----</b>	<b>271</b>



# Índice de figuras

Figura I.1. Resumen de las nanoplataformas empleadas en aplicaciones terapéuticas. Adaptada de referencias. <sup>3,4</sup> .....	16
Figura I.2. Resumen de aplicaciones de las MSNs. ....	18
Figura I.3. Estructura de la pared celular de la Mtb. Adaptada de referencia <sup>39</sup> .....	19
Figura I.4. Cascada de transmisión del bacilo patógeno Mtb. Adaptada de referencia. <sup>35</sup> .....	20
Figura I.5. Formación del granuloma y desarrollo de la patología.....	21
Figura I.6. Incorporación de nanopartículas con el antígeno de interés. Adaptada de referencia. <sup>89</sup> .....	26
Figura I.7. Representación esquemática de la iniciación de la respuesta inmune por parte de una vacuna basada en MSNs. Adaptada de referencia. <sup>102</sup> .....	28
Figura I.8. Esquema de las alteraciones adquiridas por las células cancerosas. Adaptada de referencia <sup>129</sup> .....	31
Figura I.9. Distintas moléculas dianas para terapias dirigidas en cáncer. ....	33
Figura I.10. Estrategias de vectorización de los fármacos. Vectorización pasiva (A), vectorización activa (B) hacia células tumorales (B-1) o hacia el endotelio tumoral (B-2) y liberación controlada del fármaco bajo estímulos (C). Adaptada de referencia. <sup>138</sup> .....	34
Figura I.11. Esquema del mecanismo propuesto de toxicidad de las AgNPs. Adaptada de referencia. <sup>179</sup> .....	37
Figura I.12. Descripción esquemática de la administración de fármacos en terapia antitumoral: tratamientos sistémicos y dirigidos. ....	38
Figura I.13. Representación esquemática del uso de compuertas en MSNs para liberación controlada de fármacos. Adaptada de referencia <sup>145</sup> .....	40
Figura III.1. Esquema de síntesis de las <b>MSNs</b> , en el caso de materiales fluorescentes se emplea una mezcla de alcoxisilanos (APTES-FITC y TEOS) como precursores de la sílice. ....	49
Figura III.2. Esquema de síntesis de MSNs modificadas con TSD y AgBrNPs. ....	53
Figura III.3. Imagen de TEM y representación de la simetría hexagonal de los poros de las MSNs. Se muestra la orientación de los canales en vista frontal (estructura azul) y lateral (líneas naranjas).....	56

Figura III.4. Pasos de la reacción sol-gel: hidrólisis, condensación y polimerización que sufre el alcóxisilano en la formación de los <b>MSNs</b> .....	57
Figura III.5. Esquema del mecanismo de síntesis de materiales mesoporos ordenados de sílice tipo MCM-41 mediante el modelo del cristal-líquido: A) “True Liquid Cristal Template” B) “Cooperative Liquid Cristal Template” .....	58
Figura III.6. Formación del enlace tiourea para la modificación del isocianato de fluoresceína con un alcóxisilano (APTES).....	58
Figura III.7. Esquema de funcionalización por co-condensación o “one-pot” de los <b>MSNs</b> . Adaptada de referencia <sup>207</sup> . ....	59
Figura III.8. Caracterización de las <b>MSNs</b> mediante TEM (A), SEM (B) y difracción de rayos X a bajo ángulo (C). Tabla de los máximos y los valores de $d_{hk}$ obtenidos mediante DRX (D).....	60
Figura III.9. Isotermas de adsorción de N <sub>2</sub> de las <b>MSNs</b> con y sin surfactante en el interior de los poros. Distribución del tamaño de poros en las <b>MSNs</b> sin surfactante (figura insertada)..	61
Figura III.10. Esquema de funcionalización post-síntesis o “grafting”. Se muestra la posibilidad de funcionalizar asimétricamente la superficie externa o interna de los <b>MSNs</b> . Adaptada de referencia <sup>207</sup> .....	62
Figura III.11. Esquema de funcionalización de las <b>MSNs</b> con grupos amino tanto en la superficie externa como en la interna de los materiales. ....	62
Figura III.12. Imágenes de TEM de los materiales obtenidos en la síntesis de <b>MSNs-AgNPs</b> con 1% de AgNO <sub>3</sub> y reducción térmica empleando material sin funcionalizar (arriba) y funcionalizado con grupos amino (abajo). ....	64
Figura III.13. Esquema de síntesis de los materiales <b>MSNs-AgNPs</b> .....	64
Figura III.14. Residuo orgánico (R) anclado tras la funcionalización con el reactivo TSD. ....	65
Figura III.15. Imágenes de TEM del proceso de optimización de la cantidad de precursor iónico para la obtención de <b>MSNs-AgNPs</b> .....	67
Figura III.16. Imágenes de TEM del proceso de optimización de la reducción química de los iones Ag <sup>+</sup> para la obtención de AgNPs con NaBH <sub>4</sub> (A), ácido ascórbico (B), formaldehído al 37% (C) o HEPES (D). ....	68
Figura III.17. Imágenes de TEM de los materiales obtenidos empleando un 0.01% de AgNO <sub>3</sub> y reducción térmica en horno tubular. ....	69
Figura III.18. Imágenes de TEM de las <b>MSNs-AgNPs<sub>ext</sub></b> obtenidos a partir de un 1.5% de precursor iónico y reducción térmica en horno tubular con corriente de aire.....	69

Figura III.19. Imágenes comparativas de TEM entre el material antes del tratamiento, <b>MSNs-AgNPs<sub>ext</sub></b> (izquierda) y el material tras el tratamiento, <b>MSNs-AgNPs</b> (derecha). Valores de porcentajes atómicos correspondientes a cada uno de los materiales obtenidos mediante EDS. ....	70
Figura III.20. Esquema de formación de las <b>MSNs-AgBrNPs</b> . ....	71
Figura III.21. Caracterización por TEM y EDS del material obtenido mediante tratamiento químico. Imágenes del TEM (A y B). Espectro EDS (C) y valores de % atómicos correspondientes al espectro EDS (D). ....	72
Figura III.22. Caracterización por TEM y EDS del material obtenido mediante vía térmica. Imágenes del TEM (A y B). Espectro EDS (C) y valores de % atómicos correspondientes al espectro EDS (D). ....	73
Figura III.23. Caracterización por TEM y EDS del material obtenido tras el tratamiento térmico en horno tubular. Imágenes del TEM (A y B). Espectro EDS (C) y valores de % atómicos correspondientes al espectro EDS (D). ....	73
Figura III.24. Esquema de formación de las partículas núcleo@corteza <b>Ag@MSNs</b> . ....	74
Figura III.25. Imágenes de TEM de las nanopartículas de Ag (A) y de las <b>Ag@MSNs</b> con CTAB (B). Espectros UV-visible de las AgNPs y las <b>Ag@MSNs</b> (C). Diámetro de partícula obtenido mediante las micrografías de TEM (D). ....	75
Figura III.26. Imágenes de TEM del proceso de optimización de la cantidad de AgNPs empleadas en la síntesis de las <b>Ag@MSNs</b> . Síntesis con 2.5 mL (A), 5mL (B) y 10 mL (C1-2). ....	76
Figura III.27. Imágenes de TEM de la síntesis con mitad de cantidad de TEOS. <b>Ag@MSNs</b> (A) y población heterogénea con AgNPs libres (B). ....	77
Figura III.28. Imágenes de TEM del material <b>Ag@MSNs</b> con surfactante en los poros (A) y tras la extracción por calcinación (B) o mediante el uso de disolventes (C). ....	78
Figura III.29. Imágenes de TEM y espectros de análisis por EDS de los materiales: <b>MSNs-AgNPs</b> (A-A1), <b>MSNs-AgBrNPs</b> (B-B1) y <b>Ag@MSNs</b> (C-C1). ....	78
Figura III.30. Patrones de difracción de rayos-X de bajo ángulo de los materiales modificados y sin modificar. ....	81
Figura III.31. Patrones de difracción de rayos-X a alto ángulo de los materiales finales <b>MSNs-AgNPs</b> , <b>MSNs-AgBrNPs</b> and <b>Ag@MSNs</b> . <b>MSNs-AgNPs</b> difractograma (x1/2) ....	82



Figura III.32. Isotermas de adsorción $N_2$ de los materiales MSNs con nanopartículas inorgánicas, así como los distintos materiales intermedios del proceso de síntesis (A). Distribuciones de tamaño de poro para todos los materiales (B). .....	85
Figura III.33. Esquema de funcionalización de las MSNs con grupos ácidos en la superficie externa.....	88
Figura III.34. Efecto del pH en la carga neta de la proteína.....	90
Figura III.35. Esquema de síntesis general para la obtención de materiales MSNs funcionalizadas con proteínas.....	91
Figura III.36. Residuo orgánico anclado tras la funcionalización con el reactivo TEPSPA.....	92
Figura III.37. Isotermas de adsorción $N_2$ de los materiales MSNs, antes y después de la funcionalización con grupos ácidos carboxílicos y proteínas (A). Distribuciones de tamaño de poro para las muestras mesoporosas (B). Parámetros texturales de las MSNs obtenidos por las medidas de adsorción $N_2$ (C), donde $S_{BET}$ es la superficie específica obtenida por medio de la ecuación BET, $D_p$ es el diámetro de los poros calculado por el método BJH, $V_T$ es el volumen total de poros obtenido en $P/P_0=0,99$ y $V_P$ es el volumen total de poros obtenido en $P/P_0 = 0,60$ . .....	95
Figura III.38. Espectros de $^{13}C \{^1H\}$ CP MAS NMR de materiales: <b>MSNs</b> (A), <b>MSNs-COOH<sub>ext</sub></b> (B) y <b>MSNs-BSA</b> (C). Los picos designados con # corresponden a grupos etoxi debido a una hidrólisis y condensación incompleta. ....	97
Figura III.39. Espectro de $^{13}C\{^1H\}$ NMR de BSA, en $D_2O$ (330 mg/mL). Asignación de las señales basadas en referencia. <sup>215</sup> .....	97
Figura III.40. Espectros de $^{29}Si$ MAS NMR (izquierda) y $^{29}Si$ CP MAS NMR (derecha) de <b>MSNs</b> , <b>MSNs-COOH<sub>ext</sub></b> y <b>MSNs-BSA</b> . ....	98
Figura III.41. Representación esquemática de los entornos $T^n$ en la red de sílice. <sup>216</sup> .....	98
Figura III.42. Representación esquemática de los entornos $Q^n$ en la red de sílice. <sup>216</sup> .....	99
Figura III.43. Espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF de las proteínas inmunomoduladoras libres: Ag85B (A), LprG(B) y LprA (C). ....	101
Figura III.44. Esquema de síntesis de las MSNs funcionalizados con proteínas inmunomoduladoras. ....	102
Figura III.45. Isotermas de adsorción $N_2$ de los materiales MSNs, antes y después de la funcionalización con grupos ácidos carboxílicos y proteínas (A). Distribuciones de tamaño de poro para las muestras mesoporosas (B). Parámetros texturales de las MSNs obtenidos por las	

medidas de adsorción $N_2$ (C), donde $S_{BET}$ es la superficie específica obtenida por medio de la ecuación BET, $D_p$ es el diámetro de los poros calculado por el método BJH, $V_T$ es el volumen total de poros obtenido en $P/P_0=0.99$ y $V_P$ es el volumen total de poros obtenido en $P/P_0 = 0.60$ . .....	105
Figura III.46. Espectros de $^{13}C \{^1H\}$ CP MAS NMR de materiales: <b>MSNs</b> (A), <b>MSNs-COOH<sub>ext</sub></b> (B) y <b>MSNs-LprG</b> (C). Los picos designados con # corresponden a grupos etoxi debido a una hidrólisis y condensación incompleta.....	106
Figura III.47. Espectros de $^{29}Si$ MAS NMR (izquierda) y $^{29}Si$ CP MAS NMR (derecha) de <b>MSNs</b> , <b>MSNs-COOH<sub>ext</sub></b> y <b>MSNs-LprG</b> . ....	107
Figura III.48. Imágenes de TEM del material <b>MSNs-AgBrNPs</b> antes (A) y tras la funcionalización con grupos ácidos y posterior anclaje de la transferrina (B). ....	109
Figura III.49. Esquema completo de síntesis de los nanosistemas híbridos <b>MSNs-BSA-AgNPs</b> y <b>MSNs-Tf-AgNPs</b> . ....	110
Figura III.50. Imágenes de TEM del proceso de optimización de la cantidad de precursor. Imágenes de los materiales <b>MSNs-BSA-AgNPs</b> para una $C_{Ag}$ de 5 mg/mL (A y B) y de 0.42 mg/mL (C y D).....	112
Figura III.51. Imágenes de TEM de la nucleación de AgNPs ( $C_{Ag}= 5$ mg/mL) sobre los materiales <b>MSNs-Tf</b> .....	113
Figura III.52. Imágenes de TEM de la nucleación de AgNPs ( $C_{Ag}= 0.42$ mg/mL) sobre el material <b>MSNs-Tf</b> .....	113
Figura III.53. Imágenes de TEM de la nucleación de AgNPs sobre <b>MSNs-Tf</b> empleando $C_{Ag}=0.42$ mg/mL (A y B) o $C_{Ag}=0.59$ mg/mL (C y D). ....	114
Figura III.54. Imágenes de TEM de los conglomerados de plata formados cuando se emplea la Tf libre como estabilizante.....	115
Figura III.55. Imágenes de TEM del material <b>MSNs-BSA-AgNPs</b> (A) y <b>MSNs-Tf-AgNPs</b> (B). Ampliación de AgNPs soportadas en la estructura mesoporosa (C). Análisis EDS y valores de % atómico de Si y Ag para cada uno de los materiales (D). ....	116
Figura IV.1. Esquema del procedimiento experimental del experimento SILAC. ....	132
Figura IV.2. Esquema del procedimiento experimental del ensayo SILAC con fraccionamiento de proteínas de membrana. ....	134
Figura IV.3. Estructura química de Sulfo-NHS-SS-Biotina [sulfosuccinimidil-2-(biotinamido) etil-1,3-ditiopropionato].....	135

Figura IV.4. Esquema del procedimiento experimental del marcaje SILAC con aislamiento de proteínas de núcleo.....	136
Figura IV.5. Capacidad bactericida de los materiales <b>MSNs-AgNPs</b> , <b>MSNs-AgBrNPs</b> y <b>Ag@MSNs</b> a diferentes concentraciones contra Mtb obtenida a partir de la medida de OD <sub>570nm</sub> . .....	138
Figura IV.6. Crecimiento de la bacteria Mtb en cultivos a diferentes concentraciones de los materiales <b>MSNs-AgNPs</b> , <b>MSNs-AgBrNPs</b> y <b>Ag@MSNs</b> . * muestran los valores de MIC. ....	139
Figura IV.7. Imágenes de Criomicroscopía electrónica para la evaluación del daño en la superficie celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por <b>MSNs-AgBrNPs</b> tras 24h, a una concentración subletal. Células de M. tuberculosis no tratadas con una morfología de la superficie celular intacta (A). Células de M. tuberculosis tratadas que muestran daño en la pared celular (B). Las imágenes insertadas muestran detalles de la morfología de la superficie de la célula. ....	140
Figura IV.8. Viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7 expuestos a diferentes concentraciones (5, 10 y 50 µg/mL) de los materiales <b>MSNs</b> , <b>MSNs-Ag85B</b> , <b>MSNs-LprG</b> y <b>MSNs-LprA</b> durante 24 (A) y 48 (B) h.....	142
Figura IV.9. Niveles de TNF-α secretado por macrófagos RAW 264.7 tras la exposición a 10 µg/mL de <b>MSNs</b> , <b>MSNs-Ag85B</b> , <b>MSNs-LprG</b> y <b>MSNs-LprA</b> durante 24 h. Células tratadas con LPS (100 ng/mL) son empleadas como control positivo. Los datos son evaluados mediante ANOVA y posterior test de Bonferroni. ***p < 0.001 frente al control; ##p < 0.005 y ### p< 0.001 frente a las células tratadas con <b>MSNs</b> ; ns, no significativo. ....	143
Figura IV.10. Niveles de IL-10 secretado por macrófagos RAW 264.7 tras la exposición a 10 µg/mL de <b>MSNs</b> , <b>MSNs-Ag85B</b> , <b>MSNs-LprG</b> y <b>MSNs-LprA</b> durante 24 h. Los datos son evaluados mediante ANOVA y posterior test de Bonferroni. ***p < 0.001 frente al control; ### p< 0.001 frente a las células tratadas con <b>MSNs</b> . ....	144
Figura IV.11. Imágenes de TEM de las <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> en forma anatasa a 200 (A) y 1000 mg/L(B). .....	145
Figura IV.12. Imágenes de TEM de las <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> en forma rutilo a 200 (A) y 1000 mg/L(B). .....	146
Figura IV.13. Viabilidad celular tras la exposición a diferentes concentraciones de las <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> (10 y 30 µg/mL) durante 72 h obtenida mediante el ensayo con azul de tripano. ....	147

Figura IV.14. Comparación de la viabilidad celular obtenida para células control y células tratadas con 10 µg/mL de <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> mediante diferentes métodos: ensayo MTT tradicional, ensayo MTT modificado con centrifugación y ensayo con azul de tripano. ....	148
Figura IV.15. Viabilidad celular tras la exposición a diferentes concentraciones de las <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> (1, 10, 30 y 100 µg/mL) durante 72 h obtenida mediante el ensayo MTT modificado con una etapa de centrifugación. ....	149
Figura IV.16. Cambios morfológicos producidos por la exposición a <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> (10 µg/mL). ....	150
Figura IV.17. Imágenes de TEM de secciones ultrafinas de células HaCaT control (A) y células tratadas con 10 µg/mL <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> (B). ....	150
Figura IV.18. Imágenes de TEM de secciones ultrafinas de células HaCaT tratadas con <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> (10 µg/mL) (A-C). Grado de vacuolización en células tratadas y control (D). ....	151
Figura IV.19. Evaluación del grado de apoptosis de las células HaCaT tras la exposición a 10 µg/mL de <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> obtenido mediante citometría de flujo con anexina-V marcada con FITC y yoduro de propidio. Los datos son analizados mediante un test ANOVA seguido de un test multiple de Bonferroni. ns: sin diferencias significativas ....	152
Figura IV.20. Evaluación del perfil del ciclo celular de las células HaCaT tras la exposición a 10 µg/mL de <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> obtenido mediante citometría de flujo con Hoescht. Los datos son analizados mediante un test ANOVA seguido de un test multiple de Bonferroni. ***p < 0.001 frente al control. ....	152
Figura IV.21. Esquema del ciclo celular y algunas de las proteínas implicadas en su regulación. ....	154
Figura IV.22. Niveles de ARN <sub>m</sub> de los diferentes genes implicados en la regulación del ciclo celular: CDK1, CCNB1, CDKN1A, TP53, CDK2, CCNA1 y CCNE1. Significación estadística al comparar con el control: *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001 ....	156
Figura IV.23. Análisis de los niveles expresión del inhibidor de quinasas dependiente de Ciclina p21 tras la exposición celular a <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> . ....	156
Figura IV.24. Esquema general del procedimiento SILAC (A). Distribución de los cocientes SILAC para las proteínas cuantificadas (B). Agrupación funcional de las 69 proteínas alteradas por la exposición a <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> obtenida a través de la base de datos “Gene Ontology GO” (C). Entre los principales procesos moleculares y biológicos alterados se incluyen los procesos metabólicos (MP), la respuesta al estímulo (RTS), el transporte (T), la expresión génica (GE), la señalización (S), la apoptosis (A), la regulación del ciclo celular (CCR), el plegamiento de	

proteínas (PF), los procesos metabólicos del ADN (DMP), la respuesta al estrés (RTST) y la proliferación celular (CP). .....	157
Figura IV.25. Ejemplo de un espectro de masas (Zoomscan) de un péptido marcado (población B) y sin marcar (población A) donde se observa una diferencia de masa de 3 Da, correspondiente a un péptido con carga +2 y un solo aminoácido marcado en su secuencia. ....	158
Figura IV.26. Distribución de los cocientes SILAC para las proteínas cuantificadas tras la purificación de proteínas de membrana. ....	167
Figura IV.27. Proteínas inhibidas relacionadas mediante la herramienta STRING. Proteínas que participan en la reparación de heridas y cicatrización (azul). ....	168
Figura IV.28. Análisis de expresión de las dos isoformas del receptor de transferrina, TfR1 y TfR2 mediante ensayo Western blot. La proteína GAPDH se emplea como control de carga del experimento. ....	170
Figura IV.29. Internalización celular de los materiales MSNs evaluados en células HepG2 y HaCaT expuestas a 100 µg/mL de <b>MSNs</b> , <b>MSNs-BSA</b> y <b>MSNs-Tf</b> durante 24 h (A). Significación estadística: ***p < 0,001. Histogramas de citometría de flujo de la internalización celular de <b>MSNs</b> (área gris), <b>MSNs-BSA</b> (línea azul) y <b>MSNs-Tf</b> (línea verde) evaluados en células HaCaT (B) y células HepG2 (C). ....	171
Figura IV.30. Viabilidad celular de las células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones (10, 50 y 100 µg/mL) de <b>MSNs</b> , <b>MSNs-BSA</b> , <b>MSNs-Tf</b> , <b>MSNs-BSA-AgNPs</b> y <b>MSNs-Tf-AgNPs</b> durante 24 (A), 48 (B) y 72 (C) h (n=5). Los datos fueron analizados por ANOVA, seguidos de una prueba de comparación múltiple por Bonferroni ***p < 0.001 frente a <b>MSNs-Tf</b> . ##p < 0.01 y ###p < 0.001 frente a <b>MSNs-BSA-AgNPs</b> . ....	172
Figura IV.31. Ensayo de viabilidad celular a 24 h (A) y 48 h (B) de células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones (10, 25 y 50 µg/mL) de <b>MSNs</b> y <b>MSNs-Tf-AgNPs</b> . Los datos fueron analizados por ANOVA, seguidos de una prueba de comparación múltiple por Bonferroni **p < 0.01, ***p < 0.001. ....	173
Figura IV.32. Viabilidad celular de las células HaCaT expuestas a diferentes concentraciones (10, 50 y 100 µg/mL) de <b>MSNs</b> , <b>MSNs-BSA</b> , <b>MSNs-Tf</b> , <b>MSNs-BSA-AgNPs</b> y <b>MSNs-Tf-AgNPs</b> durante 24 (A), 48 (B) y 72 (C) h (n=5). Los datos fueron analizados por ANOVA, seguidos de una prueba de comparación múltiple por Bonferroni ***p < 0,001 frente a <b>MSNs-Tf</b> . #p < 0,05 y ###p < 0.001 frente a <b>MSNs-BSA-AgNPs</b> . ....	173

Figura IV.33. Internalización de materiales de MSNs en células HepG2 (A) y HaCaT (B) expuestas a diferentes concentraciones (10, 25 y 50 µg/mL) de <b>MSNs</b> y <b>MSNs-Tf-AgNPs</b> durante 24 h (n = 3). Significación estadística: ***p < 0.001. ns: no significativo.....	174
Figura IV.34. Imágenes de secciones ultrafinas de células HepG2 expuestas a <b>MSNs-Tf-AgNPs</b> obtenidas mediante TEM. Células control (A), células HepG2 expuestas a 25 µg/mL durante 24 h (B y C) y a 50 µg/mL durante 48 h (D y E) con <b>MSNs-Tf-AgNPs</b> . Análisis EDS de las células tratadas (F). Las flechas indican la localización de MSNs. ....	175
Figura IV.35. Distribución de los cocientes SILAC para las proteínas cuantificadas en el estudio de los efectos producidos por el material <b>MSNs-Tf-AgNPs</b> .....	179
Figura IV.36. Niveles de ARN <sub>m</sub> de los diferentes genes alterados: CHERP, SHMT2, RFC3 y DDX3X. Significación estadística al comparar con el control: **p<0.01 y ***p<0.001.....	182
Figura IV.37. Niveles de de ARN <sub>m</sub> de las proteínas que forman el complejo regulador de la transición G1/S (Ciclina E y Cdk2). Significación estadística al comparar con el control: *p<0.05 y ***p<0.001.....	183
Figura IV.38. Niveles de de ARN <sub>m</sub> de las proteínas SMCHD1 y PSPI1. Significación estadística al comparar con el control: **p<0.01 y ***p<0.001 .....	183
Figura A.1. Clasificación de isothermas según la IUPAC.....	226
Figura A.2. Propiedades de las nanoparticulas y las posibles interferencias en ensayos bioanalíticos. Adaptada de referencia. <sup>331</sup> .....	231
Figura A.3. Esquema de los componentes de un citómetro de flujo. ....	232
Figura A.4. Relación de las fases del ciclo celular (G0, G1, S, G2, M) con el histograma de ADN. ....	234
Figura A.5. Etapas de la PCR. Desnaturalización del ADN (1). Hibridación de los cebadores (2). Extensión de los cebadores (3). ....	239
Figura A.6. Perfil de amplificación de la PCR donde se puede ver la fase inicial, la fase de amplificación exponencial y la fase estacionaria.....	240
Figura A.7. Mecanismo de marcaje con fluorocromos de unión al ADN en qPCR. ....	241
Figura A.8. Mecanismo de marcaje con sondas en qPCR.....	242
Figura A.9. Transcripción reversa del ARNm en cADN.....	243
Figura A.10. Parámetros del perfil de amplificación en escala lineal y en escala logarítmica (inset). ....	244

Figura A.11. Reconocimiento molecular entre el paratopo del anticuerpo y el epítopo del antígeno para la formación del complejo Ab-Ag. Adaptada de referencia. <sup>358</sup> .....	245
Figura A.12. Desnaturalización de las proteínas en SDS-PAGE y separación electroforética en función de los tamaños. ....	247
Figura A.13. Esquema de detección directa (A) e indirecta (B) en un ensayo Western Blot. Adaptada de referencia <sup>366</sup> .....	249
Figura A.14. Esquema del proceso de detección de la señal quimioluminiscente empleando ECL. ....	249
Figura A.15. Esquema de detección mediante ELISA directo. ....	250
Figura A.16. Esquema de detección mediante ELISA indirecto. ....	251
Figura A.17. Esquema de detección mediante ELISA sándwich. ....	252
Figura A.18. Esquema de detección mediante ELISA competitivo. ....	252
Figura A.19. Esquema de los principales componentes de un espectrómetro de masas para su aplicación en proteómica. ....	253
Figura A.20. Representación de las principales fuentes de iones. Esquema de la desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI) (A). Esquema de la fuente de ionización ESI. Adaptada de referencia <sup>381</sup> (B).....	255
Figura A.21. Representaciones de los principales analizadores de masas: analizador de tiempo de vuelo (TOF), adaptada de referencia <sup>356</sup> (A), analizador cuadrupolo, adaptada de referencia <sup>356</sup> (B), trampa de iones (QIT y LTQ), adaptada de referencia <sup>385</sup> (C) y orbitrap, adaptada de referencia <sup>384</sup> (D). ....	257
Figura A.22. Representación de analizadores híbridos: cuadrupolo-tiempo de vuelo ( <b>Q-TOF</b> ) (A), o dos analizadores de tiempo de vuelo ( <b>TOF-TOF</b> ) (B), trampa de iones-orbitrap ( <b>LTQ-orbitrap</b> ). Adaptada de referencia. <sup>386</sup> (C) y triple cuadrupolo ( <b>QqQ</b> ) (D). ....	259
Figura A.23. Nomenclatura de los fragmentos de péptidos. Adaptada de la referencia <sup>381</sup> .....	260
Figura A.24. Clasificación de los principales métodos de cuantificación absoluta y relativa en proteómica cuantitativa. ....	262
Figura A.25. Esquemas de trabajo en las diferentes metodologías de proteómica cuantitativa. Los cuadros naranjas y azules representan distintas condiciones experimentales. Las líneas discontinuas indican el tratamiento de muestra independiente y las líneas continuas la mezcla de las dos muestras. Adaptada de referencia. <sup>394</sup> .....	265
Figura A.26. Esquema de la metodología SILAC tradicional (A) y super SILAC (B). ....	266

Figura A.27. Reactivo ICAT. Adaptada de referencia. <sup>390</sup> .....	266
Figura A.28. Reactivo iTRAQ (A) y las posibles configuraciones de isótopos que mantienen el balance de masa entre los componentes del reactivo (B).....	268





## Índice de tablas

Tabla III-1. Cantidades de reactivos empleadas en las reacciones de anclaje covalente de las proteínas inmunomoduladoras. ....	51
Tabla III-2. Contenido de materia orgánica y análisis químico elemental de las <b>MSNs</b> y <b>MSNs-NH-NH<sub>2</sub></b> . ....	63
Tabla III-3. Cantidades de ion plata por gramo de material <b>MSNs-NH-NH<sub>2</sub></b> . ....	66
Tabla III-4. Análisis de espectroscopia de energía dispersiva de rayos-X. Porcentajes atómicos de Si, Ag y Br para los materiales <b>MSNs-AgNPs<sub>ext</sub></b> , <b>MSNs-AgNPs</b> , <b>MSNs-AgBrNPs</b> y <b>Ag@MSNs</b> . ....	80
Tabla III-5. Valores de los ángulos para el máximo de difracción de DRX (10) para la estructura mesoporosa y sus correspondientes distancias interplanares $d_{10}$ . ....	81
Tabla III-6. Identificación de los planos (hkl) de los máximos observados en los patrones de DRX y sus correspondientes valores de $d_{hkl}$ . ....	83
Tabla III-7. Parámetros texturales de los materiales <b>MSNs</b> obtenidos mediante las medidas de porosimetría de adsorción-desorción de $N_2$ . ....	86
Tabla III-8. Valores de potencial $\zeta$ y tamaño hidrodinámico de partícula en agua de las <b>MSNs</b> con nanopartículas inorgánicas. ....	87
Tabla III-9. Parámetros de las proteínas empleadas en las síntesis de materiales modificados. ....	89
Tabla III-10. Valores de pH seleccionados para las funcionalizaciones con proteínas. ....	90
Tabla III-11. Contenido orgánico y composición elemental obtenido a partir de los análisis termogravimétricos y químicos de las <b>MSNs</b> y las <b>MSNs</b> funcionalizados. ....	93
Tabla III-12. Valores de potencial $\zeta$ y tamaño hidrodinámico de partícula en agua de las <b>MSNs</b> . ....	94
Tabla III-13. Valores de los desplazamientos químicos y las poblaciones (%) de los entornos $Q^n$ y $T^n$ del silicio, así como de las relaciones de área de pico, $(Q^2 + Q^3)/Q^4$ y $Q^n/T^n$ , en función de la deconvolución de los espectros de $^{29}\text{Si}$ MAS NMR de los materiales <b>MSNs</b> . ....	99
Tabla III-14. Contenido orgánico obtenido a partir de los análisis termogravimétricos de las <b>MSNs</b> y las <b>MSNs</b> funcionalizados. Concentración de proteína sin anclar y el % de anclaje correspondiente a cada uno de los materiales finales. ....	103
Tabla III-15. Cantidades de proteína por gramo de material final. ....	103

Tabla III-16. Valores de potencial $\zeta$ y tamaño hidrodinámico de partícula en agua de las MSNs. ....	104
Tabla III-17. Valores de los desplazamientos químicos y las poblaciones (%) de los entornos $Q^n$ y $T^n$ del silicio, así como de las relaciones de área de pico, $(Q^2 + Q^3)/Q^4$ y $Q^n/T^n$ , en función de la deconvolución de los espectros de $^{29}\text{Si}$ MAS NMR de los materiales MSNs.....	108
Tabla III-18. Valores de potencial $\zeta$ y tamaño hidrodinámico de partícula en agua de las MSNs híbridos. ....	116
Tabla IV-1. Genes relacionados con el ciclo celular, sus correspondientes secuencias y códigos ID de los ensayos Taqman. ....	129
Tabla IV-2. Genes seleccionados relacionados con los efectos del tratamiento con el nanosistema <b>MSNs-Tf-AgNPs</b> , sus correspondientes secuencias y códigos ID de los ensayos Taqman.....	129
Tabla IV-3. Valores de potencial $\zeta$ y tamaño hidrodinámico de partícula en agua de las <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> . ....	146
Tabla IV-4. Tabla de proteínas desreguladas obtenidas en la evaluación del potencial citotóxico de las <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> . ....	160
Tabla IV-5. Tabla de proteínas desreguladas obtenidas en el estudio de proteínas de membrana para la evaluación del potencial citotóxico de las <b>TiO<sub>2</sub>-NPs</b> . ....	166
Tabla IV-6. Tabla de proteínas desreguladas obtenidas en el estudio del potencial antitumoral del nanosistema <b>MSNs-Tf-AgNPs</b> . ....	177

## RESUMEN

---



## DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS NANOSISTEMAS PARA SU APLICACIÓN EN BIOMEDICINA

El auge de la nanomedicina en los últimos años ha supuesto un gran avance en la monitorización, diagnóstico y control de los sistemas biológicos, y ha contribuido al desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento y la prevención de diversas enfermedades. Por ello, la presente Tesis Doctoral se centra en la síntesis y desarrollo de nuevos nanosistemas basados en nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs) para su aplicación en dos enfermedades de gran prevalencia, como son la tuberculosis y el cáncer. La tuberculosis sigue siendo hoy en día un problema de salud a nivel mundial debido a la falta de una vacuna efectiva y a la aparición de nuevas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) resistentes a los tratamientos actuales. En consecuencia, el primer objetivo específico de esta Tesis es el desarrollo de nanovacunas preventivas basadas en las nanopartículas comentadas anteriormente, las cuales son capaces de transportar proteínas inmunomoduladoras, y de nuevos nanosistemas con potencial capacidad bactericida frente a Mtb, responsable de dicha enfermedad, como alternativa terapéutica. Por otro lado, el cáncer es una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. A pesar del gran avance experimentado en cuanto al diagnóstico, prevención y tratamiento del cáncer, hoy en día sigue siendo necesario el desarrollo de nuevas terapias y nuevos compuestos capaces de detener el crecimiento tumoral y de minimizar los efectos secundarios causados principalmente por la ausencia de tratamientos dirigidos a células cancerosas. En base a esto, el siguiente objetivo específico de la Tesis es, por una parte, la evaluación en profundidad del potencial citotóxico y de los mecanismos biomoleculares implicados en el efecto inducido por exposición a nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, propuestas inicialmente como terapia antitumoral, y por la otra, el desarrollo de nanotransportadores de agentes terapéuticos selectivos hacia células cancerígenas como alternativa biocompatible. Estos nanosistemas se basan en la incorporación de transferrina (Tf) para el transporte activo y de nanopartículas de plata (AgNPs) como agente terapéutico.

Las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs) son candidatos excelentes, debido a sus cualidades y su gran versatilidad, para el desarrollo de nuevas herramientas en nanomedicina. Por ese motivo, y para la consecución de los objetivos propuestos en la presente Tesis, se ha seleccionado la estructura MCM-41 dentro de este tipo de materiales. Para su aplicación en tuberculosis se han desarrollado distintos materiales basados en MSNs capaces de soportar nanopartículas de Ag y AgBr. Los resultados de la evaluación de la capacidad bactericida frente a Mtb han demostrado un mayor potencial en el caso del material **MSNs-AgBrNPs** al reducir el crecimiento bacteriano con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 31.25 µg/mL. El estudio microscópico de la pared celular de la bacteria tras el tratamiento con dicho nanomaterial ha confirmado la degradación de la misma. Por otro lado, la

funcionalización de las MSNs con proteínas inmunomoduladoras, presentes en las vesículas naturales secretadas por Mtb, ha permitido la elaboración de nuevos candidatos a vacunas preventivas (**MSNs-Ag85B**, **MSNs-LprG** y **MSNs-LprA**). La activación del sistema inmune, tanto en la ruta proinflamatoria como antiinflamatoria por los nanosistemas propuestos, ha sido confirmada por el incremento de los niveles de citoquinas en los medios de cultivos.

En el campo del cáncer, en primer lugar se ha demostrado que las **TiO<sub>2</sub>-NPs**, empleadas en productos de uso cotidiano, así como en aplicaciones terapéuticas, provocan una reducción de la viabilidad de los queratinocitos humanos mediante un arresto del ciclo celular, pero sin incremento de la muerte celular por apoptosis. El análisis proteómico de expresión diferencial mediante la estrategia SILAC ha permitido identificar alteraciones en proteínas importantes en procesos de endocitosis de partículas, regulación del ciclo celular y respuesta a estrés. A su vez, mediante el uso de esta estrategia para el análisis específico de proteínas de membrana se ha demostrado la desregulación de algunos receptores de membrana como el EGFR, el cual se encuentra implicado en diferentes rutas de señalización que afectan desde progresión del ciclo celular y proliferación, hasta sensibilidad a estrés e inhibición de la apoptosis, así como la inhibición de varias proteínas implicadas en procesos de reparación de heridas. Por otro lado, como terapia alternativa propuesta, los resultados obtenidos con el nanosistema **MSNs-Tf-AgNPs** han mostrado una reducción de la viabilidad de las células cancerosas asociada a una internalización selectiva frente a nanosistemas homologos desarrollados como control. A su vez, los ensayos de localización intracelular han permitido evaluar la localización de los nanosistemas en el interior de lisosomas, donde se produce la degradación de las nanopartículas de plata en iones Ag<sup>+</sup>. El potencial antitumoral del nanosistema desarrollado se ha evaluado en profundidad mediante un análisis proteómico mediante SILAC y posterior validación mediante RT-qPCR, de tal forma que se ha encontrado una desregulación de proteínas implicadas en el control de la proliferación y ciclo celular, así como en invasión y metástasis. Los resultados obtenidos mediante esta estrategia han permitido conocer en mayor detalle los mecanismos moleculares afectados, confirmando así la capacidad del nanosistema como agente antitumoral.

En conclusión, en la presente Tesis se han desarrollado métodos sintéticos que han permitido la obtención de distintos materiales con excelentes cualidades para aplicaciones tanto terapéuticas (**MSNs-AgBrNPs**) como en vacunas preventivas (**MSNs-Ag85B**, **MSNs-LprG**, **MSNs-LprA**) frente a tuberculosis. La capacidad bactericida demostrada para el material **MSNs-AgBrNPs**, junto con la activación del sistema inmune producida por los materiales con proteínas inmunomoduladoras suponen, además, una base para el desarrollo de nuevos nanosistemas que engloben ambos aspectos y mejoren las efectividades observadas individualmente. A la vez, en el campo del cáncer, gracias al empleo de técnicas bioanalíticas y

estudios proteómicos se han evaluado los principales efectos citotóxicos de las **TiO<sub>2</sub>-NPs**, y se ha desarrollado el nanosistema **MSNs-Tf-AgNPs**, como alternativa biocompatible para terapia dirigida. Dicho nanosistema permite actuar selectivamente en células cancerosas, reduciendo la viabilidad de las mismas mediante distintos mecanismos moleculares.





## SUMMARY

---



## DESIGN, SYNTHESIS AND EVALUATION OF NEW NANOSYSTEMS FOR APPLICATION IN BIOMEDICINE

The emergence of nanomedicine has represented an improvement in monitoring, diagnosis and control of biological systems, as well as in the development of new therapies for the treatment and prevention of various diseases. Therefore, this Thesis focuses on the synthesis and development of new nanosystems based on mesoporous silica nanoparticles (**MSNs**) for application in two diseases of high prevalence: tuberculosis and cancer. Tuberculosis remains a global health problem, due to the lack of an effective vaccine and the emergence of new *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) strains resistant to current treatments. Consequently, the first specific objective of the Thesis includes the development of preventive nanovaccines based on the above-mentioned nanoparticles, which are capable of transporting immunomodulating proteins, and the synthesis of nanosystems with potential antibacterial capacity against Mtb, which is responsible for this disease, as a therapeutic alternative.

On the other hand, cancer is one of the principal causes of morbidity and mortality in the world. Despite the great progress made in diagnosis, prevention and treatment of cancer in the last years, it is still necessary to develop new therapies and new compounds capable of arresting tumor growth, and minimizing side effects due to the absence of treatments specifically directed to cancer cells. Based on this, the next specific objective of this Thesis is focused on the evaluation of the potential cytotoxicity and the biomolecular mechanisms involved in the effects related to TiO<sub>2</sub> nanoparticles exposure, initially proposed as anti-tumor therapy; as well as the development of selective nanotransporters of therapeutic agents towards tumour cells, as a biocompatible alternative. These nanosystems are based on the incorporation of transferrin (Tf) for active transport of silver nanoparticles (AgNPs) as therapeutic agents.

Mesoporous silica nanoparticles (**MSNs**) are excellent candidates for the development of new nanomedicine tools, due to their qualities and great versatility. For this reason, and in order to achieve the objectives proposed in this Thesis, the MCM-41 structure for this type of material has been selected. For its application in tuberculosis, different materials have been developed based on the capacity of **MSNs** for supporting Ag and AgBr nanoparticles. The results of the evaluation of the antibacterial capacity against Mtb, have shown a greater potential in the case of **MSNs-AgBrNPs** material as compared to the other ones, by reducing bacterial growth with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 31.25 µg/mL. The microscopic study of the cell wall of the bacteria after treatment with this nanomaterial has confirmed its degradation. On the other hand, the functionalization of **MSNs** with immunomodulating proteins, present in the naturally Mtb secreted vesicles, has allowed the

## SUMMARY

---

production of new candidates for preventive vaccines (**MSNs-Ag85B**, **MSNs-LprG** and **MSNs-LprA**). Activation of the immune system by the proposed nanosystems has been confirmed by increased levels of cytokines in the culture media, both in the pro- and anti-inflammatory pathways.

In the field of cancer, first of all, it has been shown that **TiO<sub>2</sub>-NPs**, used in consumer products as well as in therapeutic applications, cause a reduction in the viability of human keratinocytes by arresting the cell cycle, but without increasing cell death by apoptosis. The quantitative proteomic approach based on isotopic labelling (SILAC) has made it possible to identify important protein alterations involved in particle endocytosis, cell cycle regulation and stress response. At the same time, using this strategy for the specific analysis of membrane proteins, the inhibition of several proteins involved in wound healing processes and deregulation of some membrane receptors such as EGFR have been demonstrated. EGFR is involved in different signalling pathways that affect the progression and proliferation of the cell cycle, as well as sensitivity to stress and apoptosis inhibition.

On the other hand, as a proposed alternative therapy, the results obtained with the **MSNs-Tf-AgNPs** nanosystem have shown a reduction in the viability of the cancer cells associated with selective internalization as compared to the homologous nanosystems developed as controls. At the same time, intracellular localization assays have made possible to evaluate the location of the nanosystems inside the lysosomes where the degradation of the silver nanoparticles in Ag<sup>+</sup> ions occurs. The anti-tumour potential of the developed nanosystem has been evaluated in depth by proteomic analysis by SILAC and validation with RT-qPCR, it has been found a deregulation of proteins involved in the control of proliferation and cell cycle, as well as in invasion and metastasis. The results obtained through this strategy have allowed us to gain a deeper insight into the molecular mechanisms affected, confirming the capacity of the proposed nanosystem as an antitumour agent.

In conclusion, in the present Thesis, the development of synthetic methods have allowed to obtain different materials with excellent qualities for both therapeutic applications (**MSNs-AgBrNPs**) and preventive vaccines (**MSNs-Ag85B**, **MSNs-LprG**, **MSNs-LprA**) against tuberculosis. The demonstrated antibacterial capacity of **MSNs-AgBrNPs**, together with the activation of the immune system produced by materials with immunomodulating proteins, also provide a basis for the development of new nanosystems that encompass both aspects and improve the effectiveness observed individually. At the same time, in the field of cancer, using bioanalytical techniques and proteomic studies, the main cytotoxic effects of **TiO<sub>2</sub>-NPs** have been evaluated. Moreover, the **MSNs-Tf-AgNPs** nanosystem has been developed for targeted

therapy as a biocompatible alternative. This nanosystem allows selective action on cancer cells, reducing their viability through different molecular mechanisms.



# CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN





La nanomedicina ha emergido recientemente como especialidad científica que aúna la nanotecnología con campos de la ingeniería, física, química y biología para su aplicación en medicina. La Fundación Europea para la Ciencia define la nanomedicina como la especialidad que emplea herramientas de tamaño nanométrico para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades, así como para aumentar la comprensión de la compleja fisiopatología subyacente de las enfermedades.<sup>1</sup> Los elementos clave de la nanotecnología que se aplican en la nanomedicina son:

- El uso de herramientas y dispositivos analíticos para comprender mejor las bases moleculares de la enfermedad, la predisposición del paciente y su respuesta a la terapia, así como para permitir la obtención de imágenes a nivel molecular, celular y del paciente.
- El diseño de sistemas terapéuticos y de administración de fármacos multifuncionales de tamaño nanométrico para obtener terapias más eficaces.

En este punto es importante destacar que cuando se habla de nanopartículas o herramientas de tamaño nanométrico se está haciendo referencia a partículas con un tamaño de entre 1 y 1000 nm. Este criterio es aplicable tanto en el campo de la medicina como en el de las ciencias farmacéuticas.<sup>2</sup>

La gran relevancia que está adquiriendo la nanomedicina se debe a la gran versatilidad que ofrece para el desarrollo de nanosistemas terapéuticos o de diagnóstico, así como a la posibilidad de aunar en una sola formulación la terapia y la diagnóstico, dando lugar a los nanosistemas de teragnosis. El desarrollo de estos nanosistemas permite monitorizar la acumulación de los mismos en el tejido o células de interés, visualizar la biodistribución, cuantificar la liberación desencadenada de fármacos y evaluar la eficacia terapéutica. Uno de los aspectos más importantes de la teragnosis es su capacidad para predecir la respuesta en pacientes individuales, sirviendo como base en el camino para la medicina personalizada. Sin embargo, al tratarse de conceptos y estrategias muy innovadoras no se han evaluado completamente en ensayos clínicos.

Los componentes que se emplean en todas estas aplicaciones que ofrece la nanomedicina son muy variados e incluyen desde vectores virales, conjugados de medicamentos, nanotransportadores basados en lípidos o basados en polímeros y nanopartículas inorgánicas de distinta naturaleza (Figura I.1).<sup>3,4</sup>

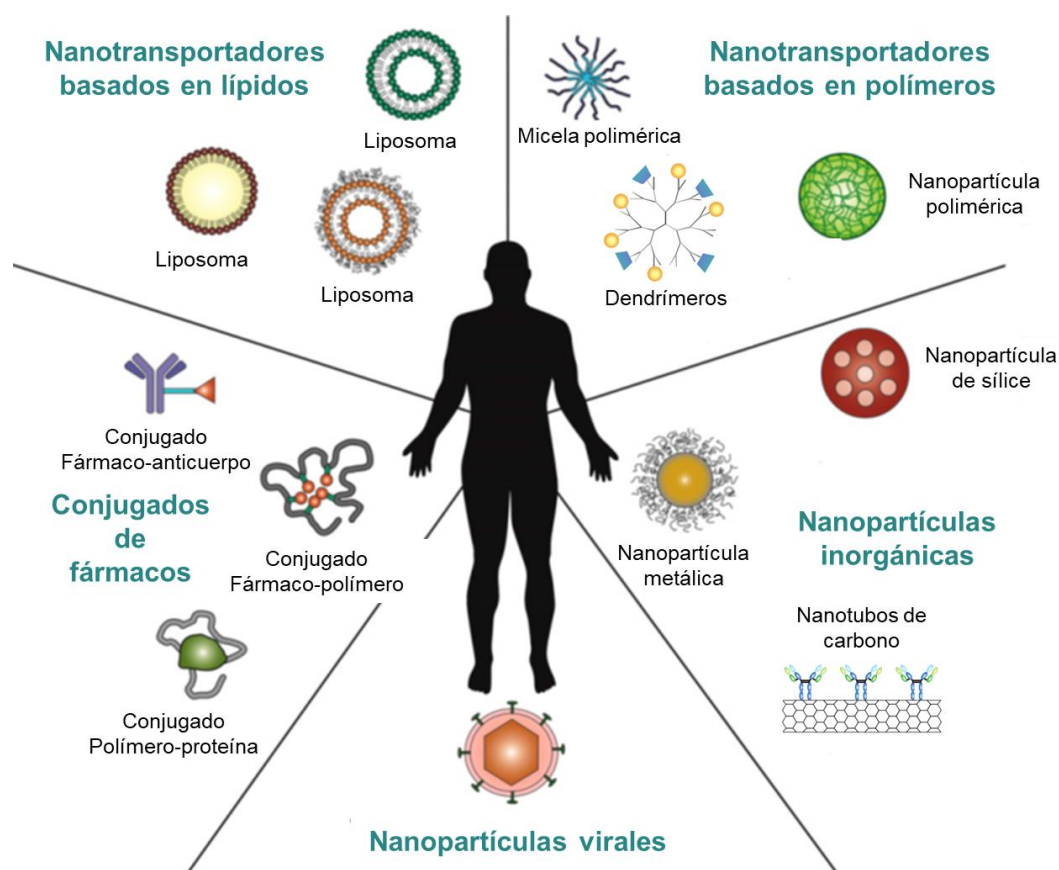


Figura I.1. Resumen de las nanoplataformas empleadas en aplicaciones terapéuticas. Adaptada de referencias.<sup>3,4</sup>

La presente Tesis Doctoral se engloba dentro de la nanomedicina, con la propuesta de desarrollo y caracterización biofuncional de nuevos nanosistemas como potencial herramienta preventiva o terapéutica en dos enfermedades de gran relevancia, como son la tuberculosis y el cáncer, sin dejar de lado la importancia de los potenciales efectos citotóxicos que supone el gran auge del uso de materiales de tamaño nanométrico. Algunos estudios sugieren que la toxicidad de las NPs es superior a las partículas de mayor tamaño con la misma composición, debido a una mayor área superficial que mejora la reactividad química, además de favorecer la internalización en las células debido a su reducido tamaño. Este hecho reafirma que las dimensiones de los compuestos empleados en las distintas aplicaciones, son críticas no solo en la actividad sino también en los efectos tóxicos que éstos pueden originar.<sup>5-9</sup>

Por lo tanto, en esta Tesis Doctoral los nuevos nanosistemas propuestos se basan en un diseño biocompatible, capaz de reducir los efectos secundarios y citotóxicos a la vez que presenten capacidades biofuncionales. Para ello, se emplean nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs, de sus siglas en inglés) que muestran unas excelentes propiedades, entre las que destacan:<sup>10</sup>

- Elevada área superficial (500-1500 m<sup>2</sup>/g)
- Gran volumen de poro (~ 1 cm<sup>3</sup>/g).
- Arquitectura porosa controlable y homogénea.
- Elevado número de grupos silanol (Si-OH) en superficie que permiten modificar la naturaleza físico-química del material mediante funcionalización.
- Dos superficies funcionalizables (interna y externa).
- Variedad de morfologías de síntesis: “bulk”, fibras, láminas, esferas, etc.

Además, las MSNs como el resto de nanomateriales inorgánicos presentan estabilidad química y resistencia a ataques microbianos cuando se comparan con los materiales equivalentes poliméricos.<sup>11-13</sup> A su vez, la matriz de los nanomateriales protege eficazmente las moléculas que se alojan en su interior, evitando la degradación y desnaturalización de las mismas por cambios de pH y temperatura.<sup>14</sup>

Las MSNs presentan una excelente biocompatibilidad y la capacidad de internalización en células.<sup>15,16</sup> Diversos estudios *in vitro* han demostrado que no presentan toxicidad en los niveles de concentración efectivos en la mayoría de las aplicaciones biomédicas ya que no se han observado efectos citotóxicos hasta los 100 µg/mL para las MSNs sin modificar.<sup>16-18</sup> Por lo general, la toxicidad e internalización de estos materiales depende del tamaño de partícula, la forma, la carga superficial y los grupos funcionales que se encuentren en su superficie.<sup>19,20</sup>

A nivel general, también se ha demostrado la biocompatibilidad de estos materiales *in vivo*.<sup>21-23</sup> Tamanoi y colaboradores investigaron en profundidad las dosis toleradas y encontraron que las dosis por debajo de los 200 mg/Kg no provocaban cambios ni alteraciones.<sup>24</sup> Lin y sus colaboradores demostraron buena hemocompatibilidad de las MSNs, lo que sugiere que pueden ser empleadas como nanotransportadores de fármacos para su administración vía intravenosa.<sup>25</sup>

En base a todas las propiedades y características de las MSNs actualmente se pueden encontrar numerosos estudios sobre sus aplicaciones en diferentes campos. En concreto, los inicios de estas nanopartículas en el campo de la biomedicina se remontan a 2001 cuando Vallet-Regí y sus colaboradores describieron por primera vez el uso de un material mesoestructurado de tipo MCM-41 como sistema de liberación de fármacos.<sup>26</sup> Desde entonces han ido creciendo el número de sistemas basados en sílice mesoporosa en sus diferentes estructuras para llegar a abarcar diferentes campos de la biomedicina (Figura I.2).<sup>27-31</sup>

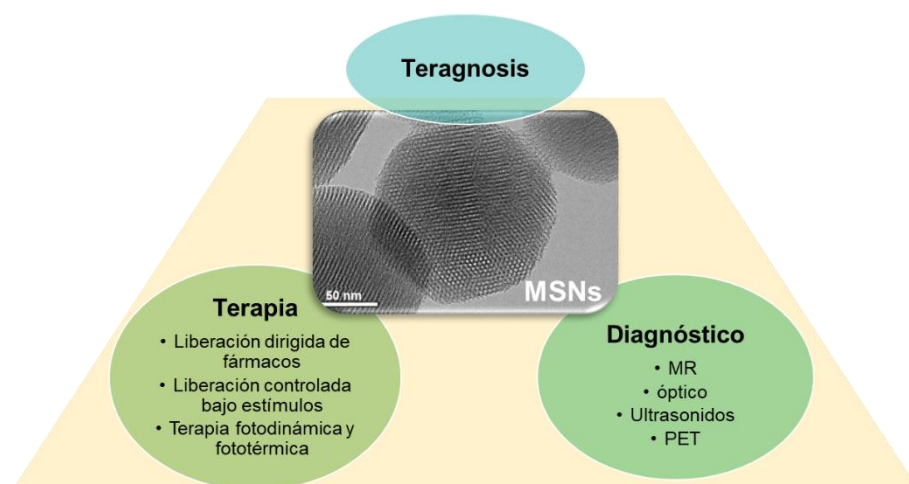


Figura I.2. Resumen de aplicaciones de las MSNs.

## I.1. NANOMEDICINA PARA EL DESARROLLO DE NUEVAS VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS

### I.1.a. Tuberculosis: infección, progresión, tratamientos y vacunas

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que hoy en día sigue siendo un problema muy importante de Salud Pública. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta enfermedad es la novena causa de muerte mundial y en 2016 se calcula que hubo 1.3 millones de muertes por TB y 10.4 millones de personas enfermaron, entre las que se encontraban 6.3 millones de nuevos casos de esta enfermedad.<sup>32</sup>

La TB es causada por miembros del complejo de micobacterias *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC, de sus siglas en inglés), que incluye entre otras especies *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb, el agente etiológico de la TB en humanos), *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae* y *M. pinnipedii*. Inicialmente Mtb surgió como un patógeno humano en ciertas partes de África oriental, sin embargo, este patógeno inicialmente no era capaz de originar una infección crónica persistente en el huésped. Fueron las evoluciones genéticas que sufrieron estas antiguas cepas y, posteriormente, con los avances de la civilización, lo que dio lugar a la selección de cepas de Mtb con mayor virulencia y transmisibilidad, tal y como se conocen actualmente.<sup>33</sup>

El descubrimiento del bacilo responsable de la tuberculosis tuvo lugar en 1882 por Koch, lo que permitió el desarrollo de los primeros fármacos antituberculosos.<sup>34,35</sup> Desde esa fecha se fueron originando distintos estudios que fueron aportando información para la comprensión de la transmisión y progresión esta enfermedad.

*Mycobacterium tuberculosis* es una micobacteria de crecimiento lento, con un tiempo de duplicación de 12-24 h en condiciones óptimas.<sup>36</sup> Una de las principales características de esta bacteria es la peculiar estructura de la pared celular (Figura I.3), que proporciona una barrera impermeable y excepcionalmente fuerte frente a los compuestos y fármacos nocivos, así como frente a la degradación a través de enzimas lisosómicas, desempeñando así un papel fundamental en la virulencia.<sup>33,37,38</sup> La membrana externa de estas micobacterias, funcionalmente similar a la que se observa en las bacterias *gram* negativas, consiste en una capa lipídica asimétrica compuesta de ácidos grasos largos, denominados ácidos micólicos, y de glicolípidos y componentes cerosos en la capa externa. La membrana externa e interna forma un espacio periplasmático con la presencia de una capa fina de peptidoglicano en el lado interno covalentemente ligado al arabinogalactano y al lipoarabinomanano, que a su vez están ligados a los ácidos micólicos.<sup>39-41</sup>

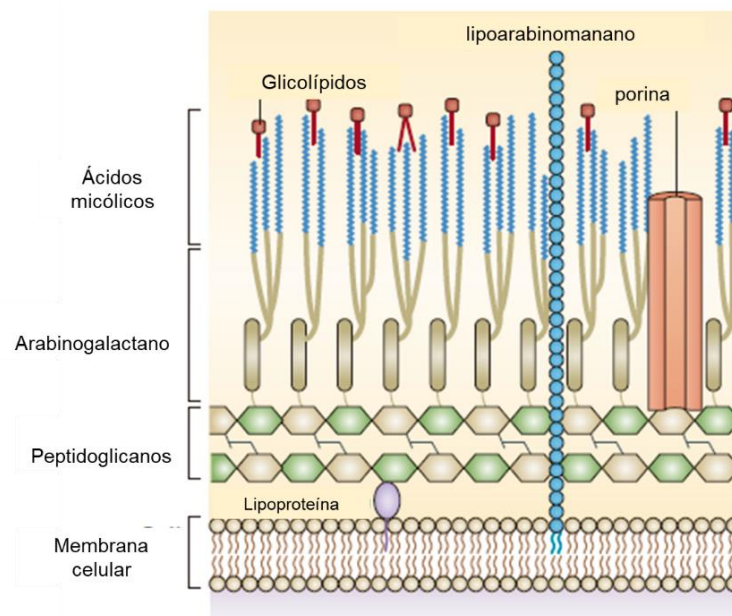


Figura I.3. Estructura de la pared celular de la Mtb. Adaptada de referencia <sup>39</sup>

La **cascada de transmisión** del bacilo Mtb se produce a partir de un individuo que contiene el bacilo activo y del cual se liberan partículas infecciosas.<sup>42</sup> El patógeno que sobrevive en el aire es inhalado por el individuo receptor de tal manera que se produce la infección y la posibilidad del desarrollo de la enfermedad en el nuevo individuo (Figura I.4).

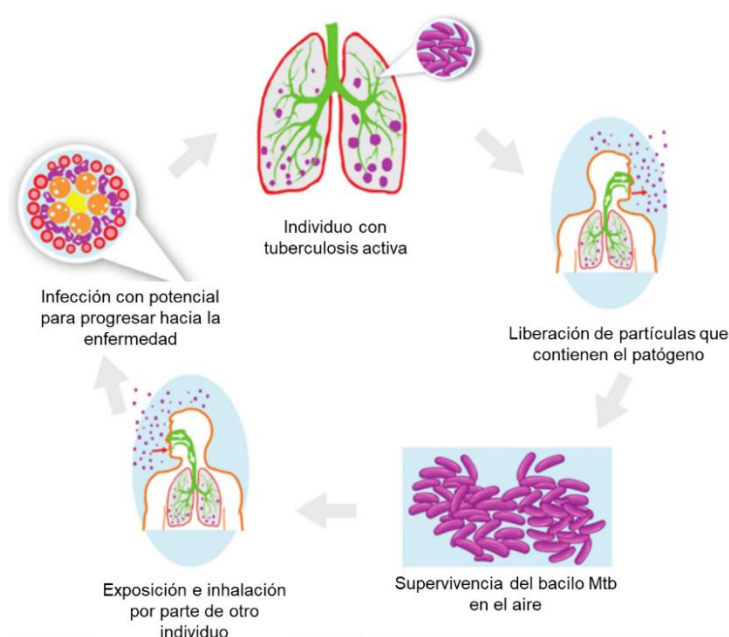


Figura I.4. Cascada de transmisión del bacilo patógeno Mtb. Adaptada de referencia.<sup>35</sup>

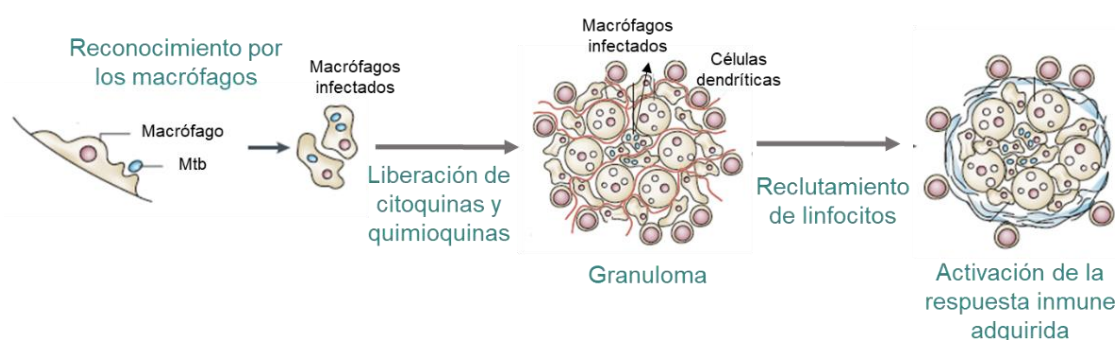
El **desarrollo de la infección** y la consiguiente enfermedad se llevan a cabo cuando el patógeno es reconocido y engullido por los macrófagos alveolares, donde Mtb se reproduce e inhibe los mecanismos de eliminación de macrófagos. A pesar de la influencia inhibitoria de esta bacteria, los macrófagos infectados secretan quimioquinas y citoquinas, lo que lleva al reclutamiento y activación de muchas poblaciones de células del sistema inmune en el pulmón.<sup>43</sup> La activación de la respuesta inmune innata depende del reconocimiento de los componentes de la pared celular de Mtb, como el ácido micólico, manano y peptidoglicanos a través de receptores de tipo Toll.<sup>44</sup> Estos receptores son importantes tanto en el reconocimiento de los antígenos micobacterianos como en la activación de los macrófagos, células dendríticas y otras células implicadas en las inmunidad.<sup>45</sup> Los bacilos de Mtb son internalizados en los macrófagos a través de receptores fagocíticos, entre los que destacan los receptores de complemento y los receptores de manosa.<sup>46</sup>

Las células inmunitarias encapsulan a las bacterias patógenas en la primera etapa de la infección por tuberculosis, en la cual se produce la multiplicación intracelular. Posteriormente, las células sobrecargadas de bacterias pueden atravesar la barrera alveolar, afectando a otros tejidos y órganos.<sup>47</sup> La supervivencia de la bacteria Mtb en los macrófagos se logra inhibiendo la acidificación del complemento fagosoma y posterior fusión del fagosoma con los lisosomas.<sup>46</sup> Generalmente, la inmunidad celular no permite la eliminación de la bacteria, la cual prevalece en estado latente en el interior del denominado granuloma.<sup>48</sup>

En la formación del granuloma no solo están implicados los macrófagos, sino que también juegan un papel importante las células dendríticas.<sup>49</sup> Estas células son células presentadoras de antígenos que, aunque forman parte del sistema inmune innato, son importantes



reguladores de la inmunidad adquirida.<sup>49</sup> Las células dendríticas tienen la habilidad única de migrar a los ganglios linfáticos desde el sitio de la infección pudiendo activar la respuesta inmune adquirida (Figura I.5).<sup>50</sup>



*Figura I.5. Formación del granuloma y desarrollo de la patología.*

La protección contra el patógeno Mtb, mediada por el sistema inmune adquirido, depende críticamente de los linfocitos T.<sup>51</sup> La respuesta de estas células tiene efectos tanto en la patogénesis como en la protección. Las células T CD4 son unas de las más importantes en la activación de los macrófagos para el control del patógeno. Estas células producen citoquinas de tipo I, como el interferón gamma (INF- $\gamma$ ) o el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) que son los efectores de las respuestas protectoras.<sup>51,52</sup>

Otras de las células de este tipo, importantes en la respuesta inmune contra la Mtb, son las CD8 que producen IFN- $\gamma$  y lisan macrófagos infectados. Además, las células Th17 juegan también un papel importante en la respuesta inmune inicial y en el reclutamiento de otras células del sistema inmune en el lugar de la infección.<sup>53</sup>

El control del crecimiento de la bacteria por parte de las citoquinas liberadas se basa en la expresión de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno combinado con el ataque enzimático lisosómico y la autofagia.<sup>53</sup> En presencia de oxígeno, una enzima asociada a los macrófagos, llamada óxido nítrico sintetasa-2, cataliza el metabolismo de la L-arginina en L-citrulina y óxido nítrico, que interviene en la eliminación del patógeno intracelular. Además, la citoquina IFN- $\gamma$  promueve la expresión de péptidos antimicrobianos (catelicidina y defensina- $\beta$ 2).<sup>54</sup>

En respuesta a todas las activaciones antimicrobianas, la bacteria Mtb ha desarrollado un conjunto de estrategias que incluyen desde la detención de la maduración del fagosoma y de su fusión con el lisosoma, tal y como se ha comentado anteriormente, hasta la modulación de las vías de muerte celular, la prevención de la presentación del antígeno y la liberación de factores antiinflamatorios que le permiten evadir su propia eliminación y establecer así la



infección latente. Cualquier alteración posterior de la respuesta inmune puede resultar en una reactivación y replicación del bacilo conllevando la necrosis y el daño del tejido pulmonar.

Actualmente existen diversos agentes antimicrobianos considerados de primera línea para el tratamiento contra la tuberculosis como la isoniazida, el etambutol, la rifampicina, la pirazinamida, la estreptomycin y combinaciones de los mismos.<sup>55</sup> La isoniazida y la rifampina son activos contra los organismos intra- y extra-celulares, y la pirazinamida se activa únicamente a pH ácido, el cual puede encontrarse en el interior de los fagosomas de los macrófagos o en los bordes de las cavidades necróticas tuberculosas en los que las células de inflamación producen ácido láctico. La estreptomycin no penetra en las células y por lo tanto es activa sólo contra los organismos extracelulares. La bacteria Mtb también es susceptible a otros medicamentos, considerados de segunda línea, que pueden utilizarse para reemplazar a los comentados anteriormente si se observan problemas de toxicidad o resistencia al medicamento. Este es el caso de las fluoroquinolonas, como la ciprofloxacina y ofloxacina, que son activas contra Mtb y penetran bien en las células infectadas.<sup>36,56</sup>

Uno de los problemas más extendidos con estos tratamientos es el desarrollo de mecanismos de defensa por parte de la bacteria.<sup>55,57,58</sup> Así, actualmente existen cepas que han sufrido modificaciones que las hace resistentes a la mayoría de los tratamientos que existen hoy en día. Por ello surge la necesidad de encontrar nuevos tratamientos contra la tuberculosis.

En el caso de las vacunas, los estudios desarrollados hasta la fecha tampoco aportan resultados satisfactorios. La mayoría de las vacunas en ensayos clínicos se centran en el reemplazo de la vacuna actual **BCG (Bacilo de Calmette-Guérin)** o como un refuerzo después de la vacunación principal.<sup>59</sup> Los nuevos candidatos incluyen vacunas de subunidades, vacunas con soporte viral o vacunas inactivadas basadas en células enteras o fragmentos celulares.<sup>59</sup>

La vacuna actual se desarrolló inicialmente a partir de una cepa virulenta de *Mycobacterium bovis*.<sup>60</sup> La atenuación de la cepa original de *M. bovis* mediante pases sucesivos en medio de cultivo supuso la creación de la vacuna Bacillus Calmette-Guerin (BCG).<sup>61</sup> Esta vacuna desempeña un papel protector contra la bacteria Mtb porque induce respuestas CD4 y CD8.<sup>62</sup> Sin embargo, solo presenta protección frente a formas de tuberculosis del tipo meningitis en recién nacidos, siendo altamente variable en la protección frente a la forma principal de tuberculosis en humanos, la tuberculosis pulmonar.<sup>59</sup>

Una de las estrategias que pueden dar lugar a nuevas vacunas es la modificación recombinante de la cepa de BCG. Una de las primeras vacunas recombinantes, denominada rBCG3, sobreexpresaba el antígeno Ag85B, el cual se ha demostrado que induce protección contra la tuberculosis en modelos animales.<sup>63,64</sup> El segundo candidato a vacuna recombinante surgió a partir de una cepa de Mtb viva con dos modificaciones y se denominó VPM1002.<sup>65</sup>

Sin embargo, estas vacunas basadas en cepas vivas no suelen tener auge dentro de las empresas farmacéuticas debido a consideraciones relacionadas con la susceptibilidad de individuos inmunodeprimidos y a los desafíos técnicos relacionados con la reproducibilidad en la obtención de la vacuna.<sup>65</sup> Por ello es necesario el desarrollo de nuevas estrategias. En este punto podemos destacar las vacunas basadas en subunidades con adyuvante o en vectores virales. Estas vacunas basan su actividad en proteínas recombinantes, consiguiendo mejor efectividad y mayor seguridad. Las proteínas que se seleccionan generalmente son inmunogénicas y secretadas por la bacteria. Algunas de las proteínas de Mtb más utilizadas en este tipo de vacunas son Ag85A, Ag85B, MTP-64, ESAT-6, hsp60 o PstS-3, y ensayos de dichas vacunas han mostrado niveles de protección similares a los obtenidos con la BCG, especialmente si se combinan con un adyuvante que induzca respuestas Th-1.<sup>66,67</sup>

Teniendo en cuenta estas características, existen diversas vacunas desarrolladas contra la tuberculosis que están basadas en vectores virales<sup>65,68</sup>, o en vacunas de subunidades donde los adyuvantes incluyen compuestos y moléculas capaces de aumentar la potencia y la duración efectiva de la respuesta inmunológica específica a los antígenos.<sup>69</sup> El principal obstáculo en el desarrollo de vacunas contra las bacterias se ha atribuido a la falta de adyuvantes que estimulen adecuadamente la inmunidad mediada por células.<sup>70</sup> Por ello, los nuevos desarrollos de vacunas contra bacterias, incluyendo la tuberculosis, se basan en este tipo de estrategia. Los adyuvantes aprobados para uso humano incluyen sales de aluminio, AS03/04 y MF59<sup>59</sup>, los cuales promueven principalmente una respuesta humoral o Th2 en lugar de Th1.<sup>70</sup> Hasta la fecha existen algunas vacunas de subunidad con carácter preventivo que se encuentran en desarrollo,<sup>65,71</sup> pero también se han desarrollado estudios para conseguir vacunas inmunoterapéuticas. La principal diana de estas vacunas es la prevención de la tuberculosis latente y reducir la necesidad de la terapia.<sup>72</sup> La vacuna terapéutica más ampliamente estudiada contra la tuberculosis es la denominada RUTI. Esta vacuna está compuesta por fragmentos celulares detoxificados de Mtb liberados en liposomas, que se cultivan bajo condiciones de estrés (afecciones intragranulomatosas) para inducir antígenos de latencia que normalmente están ocultos al sistema inmunológico.<sup>73</sup> Los estudios en modelos animales y en humanos han demostrado que esta vacuna es segura y mostrando efectos adversos leves o moderados.<sup>65</sup>

Teniendo en cuenta todos los estudios realizados hasta la fecha, podemos asegurar que no existe una vacuna candidata completamente efectiva contra la tuberculosis.<sup>65</sup> Además, en ocasiones, estos estudios se ven limitados por una escasa comprensión de la respuesta inmune humana y de los mecanismos específicos de protección frente a la infección por Mtb, así como por la falta de modelos animales validados o de relaciones inmunológicas que puedan predecir con certeza la eficacia de la vacuna en humanos.<sup>74</sup> A su vez está previsto que, aunque los

estudios de las vacunas candidatas progresen a lo largo de las distintas fases clínicas, dichas vacunas no lograrán una protección total y, en el mejor de los casos, solo llegarán a prevenir el paso de la fase latente a la activa.<sup>75</sup> Por ello el campo de desarrollo de vacunas eficaces tanto preventivas como terapéuticas sigue en auge y precisa de nuevos estudios y candidatos.

### *1.1.b. Vesículas secretadas por los patógenos y su interés en el desarrollo de vacunas*

El conocimiento de la fisiología de los patógenos durante el proceso de infección es importante para desarrollar nuevos abordajes tanto preventivos como terapéuticos. Muchos de los estudios que tratan de aclarar los mecanismos de infección de dichos patógenos se centran en entender un proceso liberación de antígenos por parte del patógeno basado en vesículas derivadas de la membrana bacteriana.<sup>76-80</sup>

Muchas bacterias patógenas intracelulares usan las vesículas derivadas de membrana (MVs) como una forma alternativa de liberar ligandos que puedan ser reconocidos por las células huésped.<sup>81,82</sup> Estas vesículas han sido ampliamente estudiadas para bacterias *Gram* negativas. En este caso, las vesículas originadas suelen variar en tamaño de 50 a 250 nm de diámetro y contienen fosfolípidos, proteínas, lipopolisacáridos (LPS) y componentes periplasmáticos, de acuerdo con el origen de las mismas en la membrana externa.<sup>83</sup> En general, estas vesículas liberadas por los patógenos pueden contener factores de virulencia adicionales como toxinas o compuestos inmunomoduladores, que son importantes para la patogénesis, y por ello su estudio presenta un gran interés científico.<sup>82</sup>

Posteriormente a los estudios para las bacterias *Gram* negativas, se han descrito sistemas de transporte vesicular en bacterias *Gram* positivas. En el caso de las micobacterias, hay varios estudios sobre la producción de vesículas que demuestran que también son importantes en este tipo de bacterias. En concreto, Prados-Rosales y sus colaboradores demostraron que diferentes cepas de *Mtb*, incluyendo la cepa de la vacuna actual (BCG), así como otras patógenas y no patógenas, son capaces de producir vesículas de entre 60 y 300 nm de diámetro.<sup>80</sup> La presencia de estas vesículas es dependiente de la viabilidad de las bacterias, de tal forma que solo se generan por bacterias que se dividen activamente. Además, al igual que se había descrito previamente para bacterias *Gram* negativas, estas vesículas son claves en la patología, ya que son portadoras de factores virales que modifican las respuestas de las células huéspedes frente a la infección. Estos hechos se demostraron mediante estudios proteómicos, en los cuales no se observaban factores de virulencia en las vesículas secretadas por las cepas no patogénicas. De acuerdo con esta idea, las MVs de los patógenos, así como las secretadas por la cepa BCG, se encuentran enriquecidas en ligandos de receptores de tipo Toll, en especial del TLR2, como son las lipoproteínas de 19 kDa, LprA y LprG. Estas proteínas son capaces de

disminuir los niveles de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII) en macrófagos y células dendríticas a través de un mecanismo de reconocimiento por los receptores TLR2.<sup>84-86</sup> Además, de acuerdo al perfil lipídico del contenido de las vesículas, se puede afirmar que se originan en la membrana de la bacteria patógena. Gracias a ese contenido proteico y lipídico, las MVs son capaces de producir una respuesta inflamatoria dependiente del receptor TLR2 y a su vez, inducir la expresión de moléculas clave, como la Cox-2 o la MMP-9, que están implicadas en eventos tempranos de formación de granulomas.

Todo el estudio de estas vesículas permite conocer un posible mecanismo por el cual la bacteria Mtb es capaz de liberar lípidos procedentes de su pared celular, y proteínas inmunomoduladoras hacia otros compartimentos dentro de la célula huésped, o incluso fuera de ésta, mediante exosomas derivados de la misma.<sup>80,87</sup> Este transporte vesicular que se ha descrito, permite abrir nuevos horizontes en la patología y en el desarrollo de vacunas contra la tuberculosis.

En base a lo comentado anteriormente, y con el fin de conocer en profundidad el alcance de estas vesículas, se pueden encontrar estudios posteriores en donde se demuestra que las vesículas no solo están implicadas en la liberación de factores virulentos, sino que además están involucradas en la adquisición de hierro por parte de la bacteria y, por lo tanto, están relacionadas con la supervivencia de la misma.<sup>76</sup> A su vez, se ha demostrado que las MVs secretadas por la cepa de Mtb patógena así como por la cepa BCG, provocan una respuesta inmune comparable con la protección que aporta la vacuna actual (BCG) sin necesidad de adyuvantes.<sup>79</sup> Estas vesículas son, por tanto, un buen candidato como nueva vacuna ofreciendo algunas ventajas sobre la vacuna convencional. Las MVs son fáciles de obtener y a diferencia de las vacunas basadas en bacterias vivas atenuadas, éstas no presentan habilidad de replicación ni causan infección o cambios a lo largo de la evolución de los cultivos. Sin embargo, existe una amplia variabilidad en los antígenos entre los diferentes grupos de vesículas aisladas, lo que conlleva una falta de la reproducibilidad en la capacidad protectora de las mismas cuando se utilizan como vacuna preventiva.<sup>79</sup> Por ello, es interesante la posibilidad de emplear vesículas o liposomas artificiales que contengan antígenos inmunogénicos para obtener respuestas protectoras más estables.

### *1.1.c. Desarrollo de nuevas vacunas basadas en nanotecnología*

La nanomedicina ha supuesto un gran auge en el campo de las vacunas ofreciendo sistemas de liberación que mejoran el procesamiento de los antígenos o sirviendo como adyuvantes para mejorar la activación inmune.<sup>88,89</sup> Dentro de este campo se pueden encontrar diferentes tipos de nanopartículas que se han empleado en el desarrollo de vacunas:<sup>89</sup>

- Nanopartículas poliméricas: destacan las basadas en ácido poliglicólico (PLG) y poli (ácido-L(+)-láctico-co-glicólico) (PLGA) por su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Estas nanopartículas encapsulan el antígeno para su liberación en ciertas células. También se han realizado estudios sobre nanopartículas basadas en polímeros naturales como los polisacáridos.
- Liposomas: están formados por fosfolípidos biodegradables y no tóxicos, y pueden encapsular antígenos dentro de su núcleo para su liberación, e incorporar glicoproteínas de la envoltura viral para formar virosomas.
- Partículas similares a los virus: se trata de nanopartículas que carecen de ácido nucleico infeccioso y están formadas por el autoensamblado de proteínas biocompatibles de la cápsida viral.
- Nanopartículas inorgánicas: sobre este tipo de nanopartículas existen diversos estudios y, aunque por lo general la mayoría no son biodegradables, la ventaja que ofrecen es su estructura rígida y la posibilidad de una síntesis controlable.

Existen diferentes formas de incorporación del antígeno con las nanopartículas: conjugación, encapsulación, adsorción o incluso una mezcla de ambos (Figura I.6).

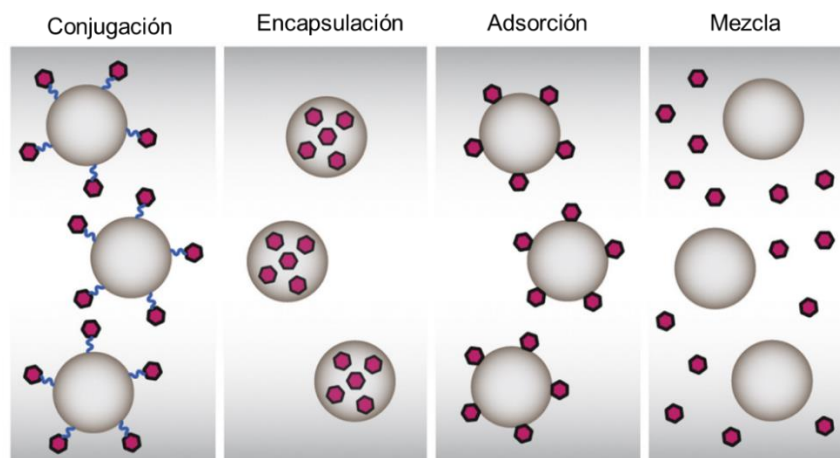


Figura I.6. Incorporación de nanopartículas con el antígeno de interés. Adaptada de referencia.<sup>89</sup>

El gran interés que ha suscitado la incorporación de los componentes antigénicos en las nanopartículas se ha centrado principalmente en la forma de administrar el antígeno de manera más eficaz a las células presentadoras de antígenos (APCs, de sus siglas en inglés), e inducir su maduración para la activación de una respuesta inmune potente.<sup>90-92</sup> Por lo tanto, y puesto que las células dendríticas (DC, de sus siglas en inglés) y los macrófagos son las principales APCs que intervienen en este proceso, es importante tener una buena comprensión

de los mecanismos de absorción de estas células y las interacciones de las mismas con las NPs, para el desarrollo de vacunas eficaces basadas en nanomateriales.<sup>93-95</sup> Los estudios han demostrado que el tamaño, la carga y la forma de las nanopartículas juegan un papel importante en la absorción de antígenos.

En general, las nanopartículas de tamaño comparable a los patógenos pueden ser fácilmente reconocidas y, por consiguiente, son absorbidas de manera eficaz por las APCs para la inducción de la respuesta inmune. Preferentemente, las células dendríticas absorben partículas del tamaño de un virus (20-200 nm) mientras que los macrófagos absorben partículas más grandes (0,5-5  $\mu\text{m}$ ).<sup>96</sup> Además del tamaño de las partículas, la carga superficial también desempeña un papel importante en la activación de la respuesta inmunológica. Las nanopartículas catiónicas inducen una mayor absorción por parte de las células presentadoras de antígenos debido a las interacciones electrostáticas con las membranas celulares que poseen densidad de carga negativa en superficie.<sup>97</sup> Varios estudios también han demostrado el efecto de la hidrofobicidad en la respuesta inmune obtenida, de tal forma que las partículas hidrofóbicas dan lugar a mejores respuestas inmunes que las hidrofílicas.<sup>98,99</sup> Además, existen otros factores que afectan a la interacción de las NPs con las APCs como es el caso de las modificaciones de la superficie del nanomaterial, con ligandos de vectorización o con moléculas para aumentar su tiempo de circulación en el torrente sanguíneo.<sup>100</sup>

Unas de las nanopartículas inorgánicas más prometedoras en el campo del desarrollo de vacunas son las basadas en sílice. Estos nanomateriales biocompatibles, que se pueden presentar en su forma mesoporosa o hueca, entre otras, ofrecen numerosas propiedades que las hacen idóneas para su uso en el transporte y liberación de antígenos o como adyuvantes. El tamaño y la forma de estos nanomateriales es controlable mediante las condiciones de reacción, y la estructura obtenida ofrece poros que permiten encapsular antígenos, así como grupos silanoles en la superficie que pueden ser modificados para el reconocimiento celular. Las MSNs se han estudiado como nanotransportadores y como adyuvantes en la liberación efectiva de antígenos.<sup>101-104</sup>

En concreto, el potencial de las MSNs como adyuvantes en vacunas se determina generalmente por el grado de maduración que son capaces de inducir en las células dendríticas.<sup>101,103,105</sup> La activación del sistema inmune producida por este tipo de nanomateriales se esquematiza en la Figura I.7. Así, se ha demostrado que las MSNs con estructura mesoporosa SBA-15 presentan la capacidad de activar respuestas de las células T a través de la señalización de las células dendríticas. Además, los estudios con diferentes modificaciones en la superficie de estas partículas han demostrado que el tamaño y la funcionalización de las partículas de sílice mesoporosas tienen un impacto significativo en las propiedades de modulación inmune. Esto sugiere que se pueden introducir cambios menores

en las superficies para obtener diferentes efectos adyuvantes, dependiendo de la aplicación médica deseada.<sup>103</sup>

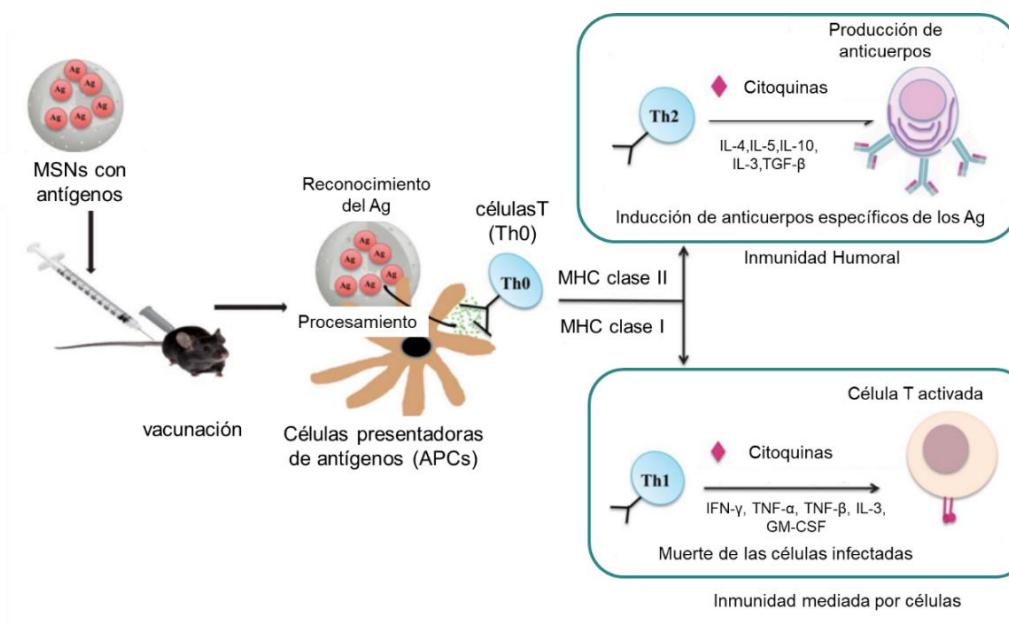


Figura I.7. Representación esquemática de la iniciación de la respuesta inmune por parte de una vacuna basada en MSNs. Adaptada de referencia.<sup>102</sup>

Todos estos resultados, que han demostrado el potencial de las MSNs como adyuvantes, son reforzados por las excelentes características que presentan estas nanopartículas para su aplicación en el campo de la nanomedicina, descritas al inicio de esta introducción.

En la presente Tesis Doctoral se realiza la propuesta de nueva vacuna contra la tuberculosis basada en MSNs. Esta idea surge como alternativa a las vesículas naturales que son secretadas por la bacteria *Mtb*, y que presentan elevados contenidos de proteínas inmunomoduladoras. Los antígenos empleados en la nanovacuna propuesta han sido seleccionados dentro del contenido proteico de las vesículas. En concreto, los estudios se centran en el antígeno de *Mtb* denominado Ag85B, del cual existen numerosos estudios de vacunas candidato, así como en dos lipoproteínas, LrpG y LprA, que son ligandos de los receptores de tipo TLR2.

El **antígeno 85B** es un producto de secreción de la bacteria que es capaz de inducir la respuesta inmune humoral, así como la mediada por las células T CD4 y CD8.<sup>106-108</sup>

La **lipoproteína LrpG** se encuentra en la pared celular de la bacteria *Mtb*. La exposición de los macrófagos a esta lipoproteína, en tiempos cortos, da lugar a la producción de TNF- $\alpha$ . Sin embargo, a tiempos largos se produce una inhibición del procesamiento de antígenos del MCHII.<sup>84</sup>



La **lipoproteína LprA** induce la expresión de citoquinas por parte de los macrófagos y células dendríticas. En el caso de las células dendríticas, LprA induce la maduración de las mismas; por el contrario, en los macrófagos su función es de regulación negativa inhibiendo la expresión y presentación de antígenos del MCHII. Por ello, esta lipoproteína es un ligando de TLR2 que es capaz de modular la función de las APCs.<sup>86</sup>

Paradójicamente, la interacción de los ligandos de Mtb con receptores TLR2 puede activar funciones que promuevan la muerte de la bacteria, pero a su vez parece que también forman parte de las estrategias para escapar de la respuesta inmune del huésped.<sup>109</sup> Por ello es importante el estudio de estos ligandos y las respuestas que estos producen. Una de las estrategias que podrían resolver el papel dual de estas lipoproteínas es la combinación de varias de ellas en un mismo sistema para la generación de las nuevas vacunas.

#### *1.1.d. Aplicaciones bactericidas y antimicrobianas de nanopartículas basadas en plata*

El efecto antibacteriano de los nanomateriales basados en plata ha sido evaluado y descrito en numerosos trabajos.<sup>110-112</sup> Las bases de estos efectos son muy diversas, desde la perturbación de procesos metabólicos bacterianos<sup>113,114</sup> o la interacción con el ADN de la bacteria,<sup>115</sup> hasta el aumento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática.<sup>116,117</sup> Debido a esta variedad de efectos que producen los nanomateriales basados en plata, su efectividad no sólo se observa contra cepas bacterianas sensibles, sino también contra las cepas altamente resistentes.<sup>118,119</sup> Generalmente, y como ocurre con otras propiedades, el efecto antibacteriano de las nanopartículas basadas en plata depende de la morfología de las partículas y de las características superficiales de las mismas.<sup>120,121</sup>

El mecanismo de acción por el cual las AgNPs ejercen su efecto antibacteriano no está muy claro, ya que algunos autores defienden que es mediante la oxidación progresiva a plata iónica ( $\text{Ag}^+$ ) mientras que otros proponen un efecto sinérgico entre las AgNPs y los iones  $\text{Ag}^+$  liberados.<sup>112,122</sup> Por otro lado, se pueden encontrar estudios donde se compara la actividad de distintos nanomateriales basados en plata, en concreto AgNPs y AgBrNPs, incluso en función del tipo de bacteria sobre la cual se aplican.<sup>123</sup> A nivel general se ha demostrado que hay diferencias en la actividad antimicrobiana relacionadas con la interacción de los materiales basados en plata con las paredes celulares de los microorganismos. En el caso de bacterias *Gram* positivas se puede observar mayor sensibilidad a las AgNPs probablemente debido a la interacción destructiva de estos materiales con las paredes celulares. Sin embargo, en el caso de las bacterias *Gram* negativas y cepas de levaduras, existe mayor sensibilidad a las AgBrNPs debido a la combinación de la interacción de las NPs con las paredes celulares y la penetración simultánea de iones  $\text{Ag}^+$  en las células. Estas diferencias mostradas en la actividad antimicrobiana en función del nanomaterial empleado puede aportar unas bases para el



desarrollo de nanosistemas antimicrobianos dirigidos selectivamente a un tipo de cepa específico.

En base a las propiedades antimicrobianas de este tipo de nanomateriales y teniendo en cuenta su potencial toxicidad en células humanas, donde se entrará en mayor detalle a lo largo de la presente Tesis, han surgido diversos estudios para la combinación de estas nanopartículas con sistemas de transporte selectivo que eviten la exposición sistémica, así como los problemas de agregación que pueden sufrir las AgNPs en aplicaciones biológicas. Algunos de ellos se basan en la combinación de estas nanopartículas con MSNs, aprovechando la biocompatibilidad y las propiedades que éstos aportan.<sup>124–126</sup>

En la presente Tesis Doctoral, se abordará la evaluación de la capacidad bactericida frente a *Mycobacterium tuberculosis* de distintos materiales basados en MSNs y plata. Los resultados de estos estudios pueden ser útiles para el desarrollo de vacunas terapéuticas contra Mtb.

## I.2. NANOMEDICINA PARA EL DESARROLLO DE TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER

### I.2.a. Características de las células cancerosas

Según la Organización Mundial de la Salud el cáncer figura entre las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial.<sup>127,128</sup> En el año 2015 produjo la muerte de 8.8 millones de personas.

El cáncer es una enfermedad mortal que sucede cuando se alteran las propiedades normales de las células. Estas alteraciones son ocasionadas por una sucesión de cambios genéticos, cada uno de los cuales confiere uno u otro tipo de ventaja para el crecimiento celular, conduciendo a la conversión progresiva de las células normales en células cancerosas. Éstas forman grandes masas de células enfermas que destruyen el tejido sano circundante. Además, la colonia de células afectadas puede diseminarse a órganos vitales y provocar la muerte del paciente.<sup>129</sup> El estudio de los genotipos de diversos grupos de células cancerosas ha permitido describir unas alteraciones que comparten la mayoría de los tipos tumorales y que son esenciales en el crecimiento maligno (Figura I.8):

- a) Autosuficiencia en las señales de crecimiento
- b) Insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento
- c) Evasión de la muerte celular programada (apoptosis)
- d) Potencial de replicación ilimitado
- e) Angiogénesis sostenida
- f) Invasión tisular y metástasis

Cada una de estas características adquiridas facilita el desarrollo del tumor y representa la ruptura exitosa del mecanismo de defensa que presentan las células normalmente.

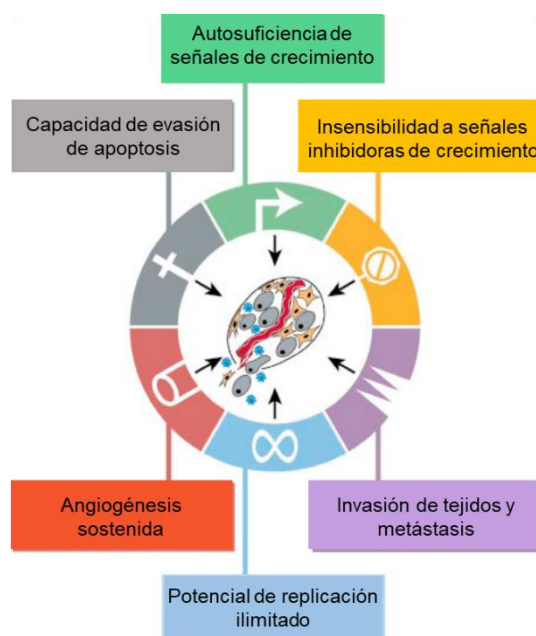


Figura 1.8. Esquema de las alteraciones adquiridas por las células cancerosas. Adaptada de referencia

129

### 1.2.b. Tratamientos contra el cáncer: nuevas terapias basadas en nanopartículas

Tradicionalmente los tratamientos más comunes contra el cáncer se han limitado a la cirugía, la radiación y la quimioterapia. Desafortunadamente, los dos últimos, implican gran cantidad de efectos secundarios debido a que la aplicación sistémica no es específica y por lo tanto la distribución tisular de los agentes anticancerosos no es selectiva hacia las células enfermas.<sup>130-132</sup> Esta absorción inespecífica del medicamento quimioterapéutico por parte de las células no malignas reduce la dosis administrada a las células malignas diana y, como resultado, se requieren dosis más altas de los fármacos para lograr la eficacia del tratamiento, sometiendo al paciente a una exposición al fármaco más prolongada. Todo esto implica una toxicidad elevada hacia todas las células incluyendo las células sanas e incluso el desarrollo de resistencia a dichos fármacos.<sup>133-136</sup>

Todos estos problemas que originan los tratamientos más tradicionales, podrían evitarse mediante el desarrollo de nuevas terapias basadas en tratamientos más eficaces y respetuosos con los pacientes, que permitan la reducción de la cantidad de fármaco y la frecuencia de la dosificación. En este punto es importante destacar el potencial de los nanomateriales como

candidatos en nuevas terapias, ya que permiten su uso como nanotransportadores para la liberación selectiva de fármacos o agentes antitumorales en los tejidos diana.<sup>3,4,137-140</sup>

Los nanotransportadores<sup>2</sup> tienen propiedades únicas tales como su reducido tamaño dentro de la nanoescala, una alta relación superficie-volumen y características físico-químicas favorables.

Existen diversas razones por las cuales la nanotecnología puede aportar avances en este campo terapéutico.<sup>4,141</sup> En primer lugar, las nanopartículas pueden ayudar a superar los problemas de solubilidad y estabilidad química de los medicamentos contra el cáncer. Además, los nanotransportadores pueden proteger los compuestos anticancerígenos de la biodegradación o excreción y, por lo tanto, influir en el perfil farmacocinético de un compuesto. Por ejemplo, los medicamentos que pueden ser degradados por enzimas, como los siARN, pueden encapsularse en los nanotransportadores o acoplarse con polímeros para resolver este problema. Pero también es importante destacar que la nanotecnología puede ayudar a mejorar la distribución y la orientación de los medicamentos antitumorales. La distribución de los fármacos anticancerígenos se define por sus propiedades fisicoquímicas y está limitada por la penetración de fármacos en el tejido tumoral.<sup>142,143</sup> Aquí podemos destacar que existen tanto estrategias de vectorización pasiva como activa para conseguir dirigir selectivamente los fármacos anticancerígenos.

La primera generación de nanotransportadores para terapias contra el cáncer se basaba en la **vectorización pasiva** (Figura I.10 A). Para este tipo de vectorización se aprovechan las características patológicas de las células cancerosas y del entorno tumoral. En concreto, es el denominado **efecto de permeabilidad y retención mejoradas (EPR)** el que promueve la acumulación de los nanomateriales en el tumor. Este efecto fue descrito por primera vez por Matsumura y Maeda en 1986 cuando comprobaron que las macromoléculas superiores a 50 KDa podían acumularse preferentemente en el intersticio del tumor y permanecer allí por un periodo de tiempo prolongado.<sup>144</sup> Debido al crecimiento excesivo de las células cancerosas en los tumores sólidos, la demanda de nutrientes y de oxígeno aumenta, de tal manera que se promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos. Sin embargo, este proceso es muy rápido y descontrolado por lo que los nuevos vasos son irregulares y presentan fenestraciones entre los 200 y los 2000 nanómetros de tamaño.<sup>145</sup> Así, cuando los componentes sanguíneos llegan a los vasos tumorales se extravasan a través de las fenestraciones hasta los intersticios del tumor. Además, a diferencia de los tejidos normales, en los tumores sólidos el drenaje linfático es deficiente. Por lo tanto, mientras que las moléculas con un tamaño de unos pocos nanómetros pueden difundir de nuevo al torrente sanguíneo, la difusión de partículas o moléculas mayores se ve impedida por su radio hidrodinámico, lo que favorece su acumulación

en los intersticios. En estos hechos se basa el efecto EPR y la vectorización pasiva de los nanotransportadores.<sup>146</sup>

Sin embargo, esta vectorización pasiva no es suficiente para controlar los efectos secundarios de los fármacos citotóxicos, y por ello se tiende a aprovechar las ventajas de la vectorización activa.

La **vectorización activa** (Figura I.10 B) utiliza la sobreexpresión de diferentes receptores de superficie en las células tumorales debido a la mayor necesidad de nutrientes que soporten el aumento del crecimiento de dichas células. Generalmente, los tumores sólidos están compuestos de una mezcla de células tumorales y células sanas, por lo tanto, el desarrollo de nanotransportadores que puedan discriminar entre ambos tipos celulares es crucial para una terapia selectiva. Por ello, la vectorización activa se basa en el anclaje de ligandos que sean específicamente reconocidos por alguno de los receptores sobreexpresados en la superficie de las células tumorales, o por receptores sobreexpresados en las células de los vasos sanguíneos del entorno tumoral. Existen numerosos ligandos empleados en este tipo de vectorización incluyendo pequeñas moléculas tales como ácido fólico<sup>147</sup> y carbohidratos, o macromoléculas como péptidos, proteínas, anticuerpos, aptámeros y oligonucleótidos.

Algunas de las moléculas diana más empleadas se muestran en la Figura I.9.

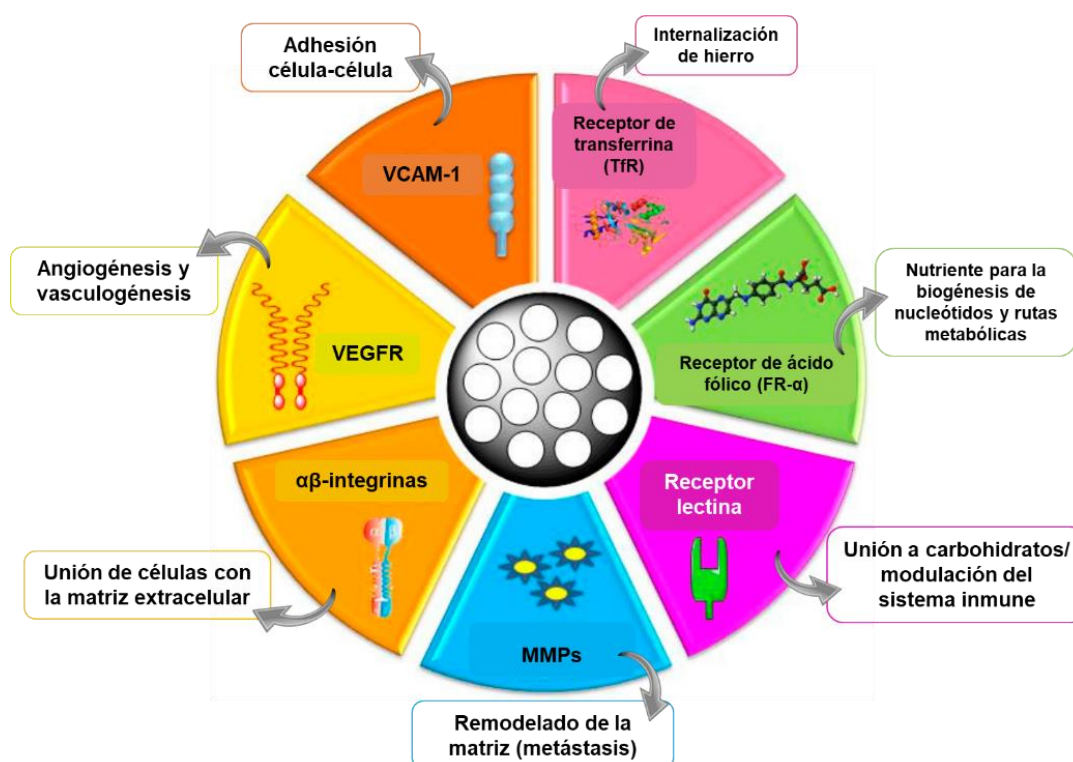


Figura I.9. Distintas moléculas dianas para terapias dirigidas en cáncer.

De entre las diferentes dianas utilizadas en terapias dirigidas en cáncer que se han mencionado anteriormente, el receptor de transferrina (TfR) ofrece la ventaja de que es especialmente relevante para el crecimiento celular, ya que funciona junto con la glicoproteína transferrina para asistir la internalización de hierro al interior de la célula. La selección de esta diana ofrece, además, ventajas adicionales frente a otros receptores de células tumorales, ya que el mecanismo de esta vectorización es promovido simplemente por metabolismo de nutrientes, por lo que no implica grandes cascadas de señalización. Por ello, en la presente Tesis se mostrarán los resultados obtenidos en el desarrollo de un nuevo nanosistema que emplea el receptor de transferrina como molécula diana.

Para una terapia eficaz, los nanotransportadores deben ser lo suficientemente estables para evitar la liberación prematura del fármaco y la degradación del mismo en el transporte. Además, es importante evitar interacciones no deseadas con las proteínas del suero o el sistema inmunológico (proceso de opsonización) que pueden llevar a la retirada prematura del nanotransportador.<sup>148</sup> Por lo tanto, es necesario optimizar la densidad del ligando empleado para mantener el nanosistema “enmascarado” y evitar el reconocimiento rápido por parte del sistema reticuloendotelial (RES).<sup>149</sup>

Generalmente, en la vectorización activa también es importante optimizar la densidad del ligando por nanotransportador para conseguir una vectorización eficaz pero también la internalización óptima del mismo.<sup>150,151</sup> En definitiva, se debe encontrar un balance entre un buen reconocimiento y unión del ligando y una baja opsonización del nanosistema.

La vectorización activa ofrece como ventaja un aumento de la retención del fármaco en el tumor debido a que se reduce la internalización del mismo en células no específicas, así como los mecanismos de resistencia.<sup>4</sup>

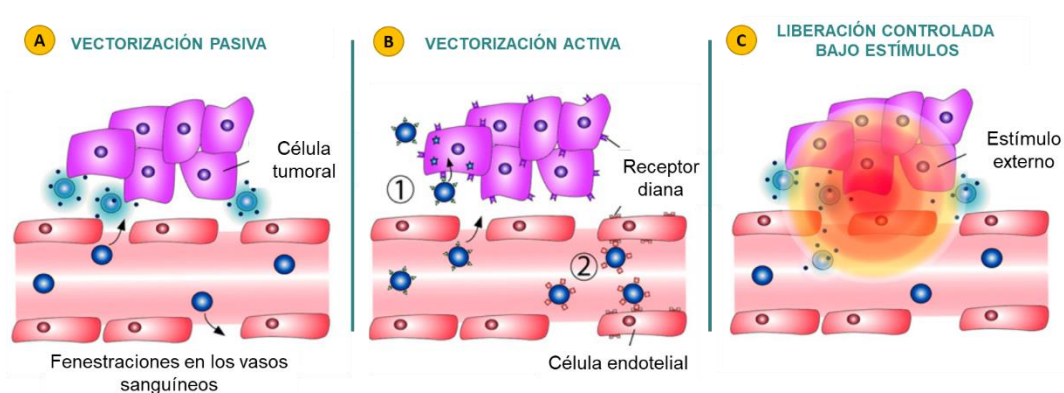


Figura I.10. Estrategias de vectorización de los fármacos. Vectorización pasiva (A), vectorización activa (B) hacia células tumorales (B-1) o hacia el endotelio tumoral (B-2) y liberación controlada del fármaco bajo estímulos (C). Adaptada de referencia.<sup>138</sup>

Finalmente, el campo de la nanotecnología ofrece la posibilidad de combinar las ventajas de la vectorización con la **liberación controlada bajo estímulos** (Figura I.10 C). La ventaja que ofrecen estos nanosistemas es que el fármaco es liberado en respuesta a un estímulo externo o interno, una vez que ha llegado al tejido o célula de interés. Así se reduce la exposición sistémica de los tejidos sanos a dicho compuesto.

*a) Aplicaciones de nanopartículas de dióxido de titanio en nanomedicina contra el cáncer*

Las nanopartículas de dióxido de titanio (**TiO<sub>2</sub>-NPs**) son empleadas en diversas aplicaciones biomédicas debido a su elevada actividad catalítica y su reducido tamaño, el cual confiere una gran superficie por unidad de masa y un número máximo de electrones en superficie para mejorar su reactividad.

Entre las aplicaciones biomédicas en el campo del cáncer de estas nanopartículas podemos destacar: terapia fotodinámica<sup>152-154</sup>, terapia sonodinámica<sup>154</sup>, desarrollo de sistemas de liberación de fármacos, desarrollo de implantes<sup>154</sup> e imagen celular en diagnóstico.

Sin embargo, el gran auge de las TiO<sub>2</sub>-NPs en aplicaciones biomédicas se puede ver limitado por los efectos adversos que pueden ocasionar. Existen diversos estudios donde se demuestra que la exposición crónica o sub-crónica a TiO<sub>2</sub>-NPs provoca inflamación, hiperplasia epitelial y carcinoma pulmonar en modelos murinos.<sup>155-157</sup> Además, gracias a dichos estudios se puede afirmar que las TiO<sub>2</sub>-NPs pueden acumularse y afectar tanto a los pulmones, los riñones, el hígado y el bazo, como al sistema nervioso entre otros componentes del organismo.

Los efectos toxicológicos que generan las TiO<sub>2</sub>-NPs se relacionan con respuestas inflamatorias que dan lugar a un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS).<sup>158-162</sup> El origen de los ROS se encuentra en la fotoactivación de las NPs e incluso en la interacción de las NPs con componentes celulares. Esta ventaja que ofrecen las TiO<sub>2</sub>-NPs para ocasionar la muerte de células tumorales puede suponer, a su vez, un riesgo para las células sanas. Como puede observarse en diversos estudios, la producción de ROS origina daños en el ADN, genotoxicidad, alteraciones cromosomales y transformación celular, incluso en células obtenidas de tejidos sanos.<sup>161</sup> Es importante destacar que, aunque esos daños se asocian a la producción de ROS, los mecanismos moleculares por los cuales se lleva a cabo la activación de las distintas rutas siguen siendo un campo en estudio.

*b) Aplicaciones de nanopartículas de plata en nanomedicina contra el cáncer*

Las nanopartículas de plata (**AgNPs**) presentan diversas aplicaciones en el campo de la biomedicina<sup>163-166</sup> además de su uso como agente bactericida y antimicrobiano. En concreto,

algunas de sus aplicaciones biomédicas se centran en su uso como fotosensibilizadores o radiosensibilizadores, agentes de detección o agentes antitumorales.

Dentro de las aplicaciones terapéuticas destacan el uso de dichas nanopartículas como inhibidores de la angiogénesis y como inhibidores del crecimiento tumoral.<sup>164,166</sup> La angiogénesis es un proceso clave en el desarrollo del cáncer, puesto que la generación de nuevos vasos sanguíneos permite que las células tumorales tengan los nutrientes necesarios para sobrevivir. Sin embargo, este mismo hecho permite que las células tumorales puedan migrar a otras regiones del cuerpo. Por ello, ciertas terapias antitumorales están basadas en inhibidores de la angiogénesis. Las AgNPs tienen aquí un papel importante ya que existen estudios que demuestran que son capaces de inhibir el crecimiento celular, la migración y la formación de capilares inducida por VEGF.<sup>167-169</sup> Estas propiedades se atribuyen a la capacidad de las AgNPs para inhibir la ruta de señalización de supervivencia celular denominada PI3K/Akt.<sup>170</sup> En cuanto a su uso como inhibidor del crecimiento tumoral, se ha observado que las AgNPs inhiben la división celular de forma dependiente del tiempo y de la concentración de las mismas.<sup>171</sup> Además, a estas AgNPs se les atribuye la capacidad de inducir apoptosis en células tumorales, ofreciendo así otra diana terapéutica.<sup>166</sup> Recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha demostrado que las AgNPs de 10 nm son capaces de inducir estrés nucleolar en células tumorales (enviado *Nanotoxicology*, 2018), lo que constituye una de las dianas terapéuticas más interesantes exploradas en los últimos años.<sup>172</sup>

Actualmente, existen diversos estudios que demuestran la efectividad de estas NPs frente a diferentes tipos de tumores, como la leucemia, cáncer hepático, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de piel.<sup>163,165</sup>

En el campo de la diagnosis, las AgNPs juegan un papel importante como fotosensibilizadores y radiosensibilizadores.<sup>163</sup> Generalmente, en esta aplicación suelen aparecer combinadas con otras nanopartículas como las de oro. Así, se ha demostrado que, nanoestructuras que contienen Au y Ag pueden absorber la radiación del infrarrojo cercano y pueden aplicarse en terapia fototérmica.<sup>173</sup> Esta terapia es similar a la terapia fotodinámica, pero en este caso la activación del fotosensibilizador da lugar a energía vibracional que se libera en forma de calor, siendo ese calor el responsable de la muerte celular. Además, las AgNPs son empleadas en detección e imagen de tumores mediante espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS).<sup>164,174</sup> Esta técnica se basa en la mejora de la intensidad Raman en varios ordenes de magnitud. Las nanopartículas de plata presentan alta absorción y dispersión de luz en las regiones de longitud de onda de resonancia plasmónica,<sup>175</sup> por ello pueden emplearse en este tipo de aplicaciones de imagen.



A pesar del potencial de estas nanopartículas en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, existe un problema por su potencial toxicidad que limita su aplicación a nivel sistémico. Existen diversos estudios que demuestran que las AgNPs pueden originar citotoxicidad, inmunotoxicidad y genotoxicidad.<sup>164,176,177</sup> Uno de los principales efectos de estas nanopartículas es la reducción del contenido de ATP de las células, originando daño mitocondrial y un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS). A nivel de genotoxicidad estas nanopartículas producen daños en el ADN y ruptura cromosomal.<sup>176</sup> Este daño en el ADN causa a su vez una parada en el ciclo celular en las fases G2/M. Este hecho se ve reforzado por la reducción de ATP, comentada anteriormente, que favorece un fallo en la reparación del ADN.

En base a todos los estudios de toxicidad de las AgNPs, se han propuesto diferentes mecanismos por los cuales se desencadenan los efectos citotóxicos. A nivel general se puede decir que la toxicidad asociada a las AgNPs está relacionada con la transformación y la oxidación de la superficie de las partículas en el medio biológico.<sup>178</sup> A nivel de mecanismo molecular se ha propuesto que las NPs provocan una disrupción de la cadena respiratoria mitocondrial y con ello se producen ROS e interrupción de la síntesis de ATP dando lugar a daño en el ADN y disminución en la proliferación celular (Figura I.11).<sup>176,178,179</sup>

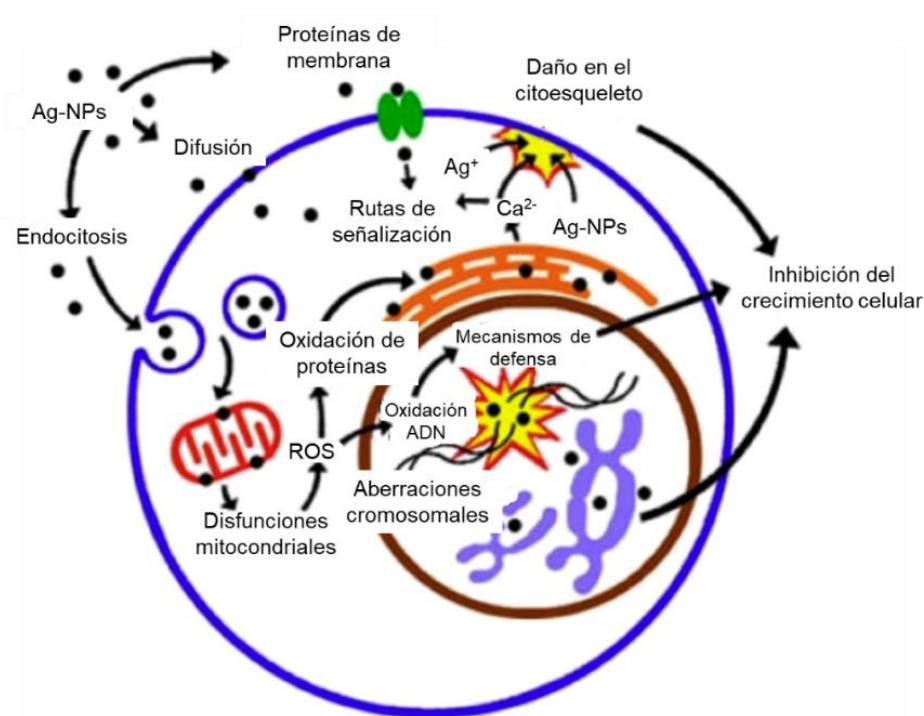


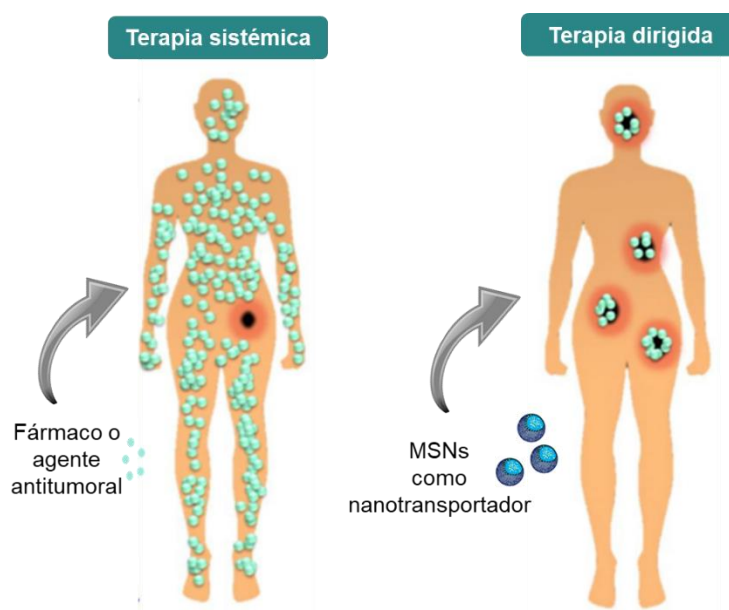
Figura I.11. Esquema del mecanismo propuesto de toxicidad de las AgNPs. Adaptada de referencia.<sup>179</sup>



Esta toxicidad que puede ser aprovechada contra las células tumorales puede, por el contrario, suponer un efecto negativo en las células sanas. Por ello, es necesario que la aplicación de estas nanopartículas en terapias contra el cáncer sea realizada de forma que la exposición a las mismas sea reducida y selectiva hacia las células de interés. Este hecho es generalizado para todas las nanopartículas que presentan un potencial efecto antitumoral pero que llevan asociados unos elevados efectos citotóxicos, como ocurre en las anteriormente citadas  $\text{TiO}_2$ -NPs.

### *c) Nanopartículas de sílice mesoporosa para el desarrollo de nuevas terapias en cáncer*

Las MSNs presentan unas excelentes cualidades que, junto con su biocompatibilidad, hacen de estas nanopartículas unas candidatas excelentes para su uso en aplicaciones terapéuticas selectivas que puedan sustituir a las terapias tradicionales, las cuales se basan en administraciones sistémicas y, por tanto, muy invasivas (Figura I.12).



*Figura I.12. Descripción esquemática de la administración de fármacos en terapia antitumoral: tratamientos sistémicos y dirigidos.*

En concreto, las MSNs ofrecen ventajas dentro de la **vectorización pasiva** entre las que se pueden encontrar:<sup>145</sup>

- El **tamaño de partícula**: La posibilidad de sintetizar y modificar los tamaños de partícula de estos materiales permite obtener partículas de al menos 50 nm, sin perder la mesoporosidad y siendo capaces de evitar la depuración renal de las mismas. Pero a su vez, permite controlar dicho tamaño de partícula por debajo de los 300 nm para permitir

la difusión a través del intersticio tumoral en cantidades suficientes para tener efectividad terapéutica.<sup>180,181</sup>

- **Forma de partícula:** Las distintas modificaciones que pueden realizarse en la forma de los materiales finales permiten influir en los tiempos de circulación *in vivo*, pero también en las dosis permitidas.<sup>145</sup>
- **Propiedades de la superficie:** Este factor, junto con el efecto EPR que sufren estos materiales de forma natural, son importantes para mejorar los tiempos de circulación y asegurar una buena acumulación en los tumores. Es decir, que las distintas modificaciones sobre la superficie permiten que estos materiales puedan escapar del reconocimiento por parte del sistema reticuloendotelial (RES), el cual provocaría la eliminación o depuración de los mismos. Una de las estrategias más empleadas con este propósito es la modificación con polietilenglicol (PEG) o derivados que, a su vez, mejora la estabilidad de las MSNs en fluidos biológicos.<sup>182</sup>

En el caso de la **vectorización activa**, las MSNs ofrecen ventajas gracias a la facilidad de modificación de su superficie, la cual presenta un elevado contenido en grupos silanol, que se utilizan para la unión covalente de las moléculas que son reconocidas por los receptores sobreexpresados en las células tumorales.

Finalmente, hay que destacar que las MSNs ofrecen la posibilidad de combinar distintas vectorizaciones.<sup>183</sup> Además, el empleo de funcionalizaciones específicas que confieran al nanosistema la posibilidad de liberar el fármaco o agente antitumoral bajo ciertos estímulos, puede conseguirse mediante la unión del fármaco a las MSNs a través de enlaces estímulo respuesta o bien mediante la carga del fármaco en los poros de la red de sílice, y la posterior funcionalización del material con agentes de captura o con elementos que actúen como compuertas.<sup>14,145</sup> La liberación del fármaco se produce por el estímulo que provoca la retirada de la compuerta y con ello la liberación del agente antitumoral (Figura I.13).

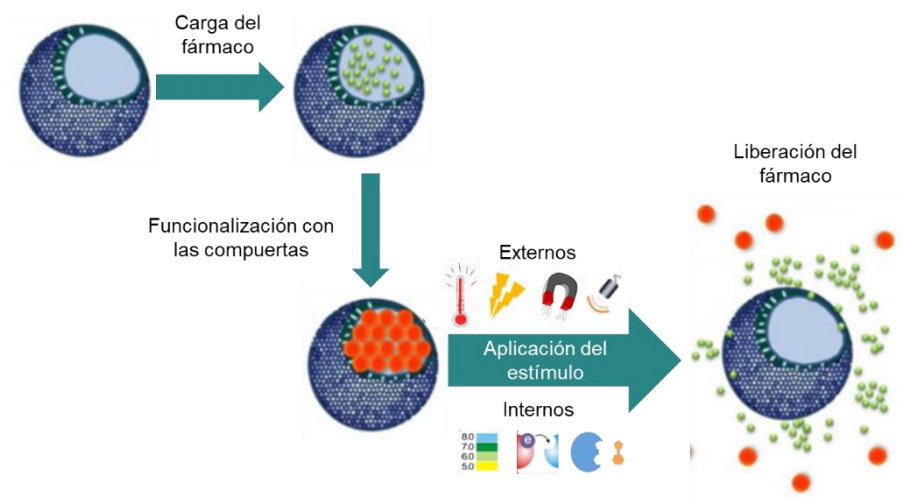


Figura I.13. Representación esquemática del uso de compuertas en MSNs para liberación controlada de fármacos. Adaptada de referencia<sup>145</sup>.

La variedad de estímulos que pueden emplearse en estos materiales van desde estímulos externos basados en temperatura,<sup>184</sup> campo magnético<sup>185,186</sup>, ultrasonidos<sup>187</sup> o luz<sup>188</sup>, hasta estímulos internos propios del organismo tales como cambios de pH,<sup>189-191</sup> de potencial redox<sup>192</sup> o por la acción de ciertas enzimas.<sup>193</sup>

Los numerosos estudios de estos materiales de sílice mesoporosa para su aplicación en terapias contra el cáncer, demuestran las excelentes propiedades que presentan sin perder de vista el balance con su potencial toxicidad, puesto que a los niveles necesarios para confirmar la efectividad de los mismos se mantienen biocompatibles. Por ello, en la presente Tesis Doctoral se han empleado estos MSNs como alternativa biocompatible para el desarrollo de nuevos nanosistemas que permitan dirigir, no solo algunos de los fármacos actuales, sino también otros agentes con actividad antitumoral pero que suelen presentar elevados efectos secundarios en células sanas, como es el ejemplo de las nanopartículas de plata y de dióxido de titanio, comentadas anteriormente.

## CAPÍTULO II. OBJETIVOS

---



Los diversos avances de la nanomedicina aportan nuevas bases para el desarrollo de terapias y vacunas con mayor eficacia reduciendo la toxicidad, la dosis y los efectos secundarios que conllevan los tratamientos actuales. Sin embargo, puesto que es un campo en continuo crecimiento, a día de hoy todavía existen aspectos importantes que tienen que ser evaluados y desarrollados. De acuerdo a estas premisas y a lo expuesto en la introducción de la presente Tesis, es importante llevar a cabo estudios que engloben desarrollos de nanosistemas en distintos campos de la nanomedicina, así como caracterizaciones funcionales que permitan conocer en profundidad los mecanismos moleculares afectados y las respuestas producidas en modelos celulares y animales tras el tratamiento con los nuevos nanosistemas. Todo ello, con el fin de llegar a un equilibrio sostenible entre la biocompatibilidad y la efectividad de las nuevas propuestas.

Por ello, el **Objetivo General** de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo de nanosistemas basados en nanopartículas de sílice mesoporosa como herramientas preventivas o terapéuticas frente a la tuberculosis y el cáncer. Junto con su posterior caracterización funcional mediante el desarrollo y aplicación de estrategias (bio)analíticas de elevada sensibilidad y selectividad.

Debido al carácter multidisciplinar de la presente Tesis el objetivo general se aborda a través de varios objetivos específicos que se describen a continuación:

- **Objetivo 1: Diseño, síntesis y caracterización analítica de nanosistemas con interés biomédico.** Este objetivo se centra en la obtención, mediante protocolos de síntesis reproducibles, de nanosistemas basados en nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs) que permitan, por una parte, la inmovilización de proteínas inmunomoduladoras (PI) o agentes bactericidas para su aplicación como vacuna preventiva o terapéutica frente a tuberculosis; y por la otra, la inmovilización de ligandos, en concreto de transferrina (Tf), para poder dirigir de forma selectiva AgNPs a células cancerígenas.
- **Objetivo 2: Evaluación de la toxicidad y localización de los nanosistemas en modelos *in vitro* mediante ensayos bioanalíticos.** Mediante este objetivo se pretende evaluar la toxicidad y la biocompatibilidad de los nanosistemas propuestos en distintos tipos de líneas celulares (HaCaT, HepG2 y RAW264.7), así como la localización e internalización de los mismos en las células objetivo mediante microscopía electrónica de transmisión y citometría de flujo.

- **Objetivo 3: Caracterización biofuncional de los nanosistemas en modelos *in vitro* mediante ensayos bioanalíticos.** En este objetivo, y tras conocer la información sobre la toxicidad y biocompatibilidad de los nanosistemas sintetizados, se pretende estudiar la efectividad de los mismos. En el caso de la tuberculosis, se evalúa la capacidad inmunogénica de los nanosistemas con proteínas inmunomoduladoras (**MSNs-PI**), y la capacidad bactericida de los nanosistemas con partículas basadas en plata (**MSNs-AgNPs**, **MSNs-AgBrNPs** y **Ag@MSNs**). En el caso del cáncer, se estudia el potencial citotóxico de las  $\text{TiO}_2$ -NPs, que si bien fueron las primeras candidatas durante el desarrollo de nanosistemas frente al cáncer en la presente Tesis, posteriormente, y en base a los resultados obtenidos, fueron sustituidas por las AgNPs. Dentro de este objetivo también se evalúa la efectividad del transporte activo, así como la capacidad terapéutica frente a células cancerígenas del material **MSNs-Tf-AgNPs**.
- **Objetivo 4: Elucidación de los mecanismos biomoleculares implicados en el potencial terapéutico antitumoral de los nanosistemas propuestos.** Este objetivo pretende cubrir un aspecto importante a la hora de proponer estos nanosistemas como agentes terapéuticos, que consiste en entender y explicar los mecanismos biomoleculares implicados en su efecto, a la vez que ampliar el conocimiento a nivel molecular de la enfermedad estudiada. Con este propósito se emplean técnicas de proteómica cuantitativa para llevar a cabo la evaluación de la expresión diferencial de proteínas tras la aplicación de la terapia, a la vez que técnicas de expresión de ARNm como la qPCR para la validación de los resultados y la obtención de información relacionada con los mecanismos moleculares.

**CAPÍTULO III. SÍNTESIS Y  
CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE  
NANOMATERIALES BASADOS EN  
SÍLICE MESOPOROSA**





**E**n este capítulo se describen las estrategias sintéticas y la caracterización analítica de los diversos nanosistemas de sílice mesoporosa obtenidos, sus modificaciones en la superficie externa con biomacromoléculas, así como la nucleación de nanopartículas inorgánicas basadas en plata.



### III.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las manipulaciones en atmósfera inerte se han realizado en línea de vacío utilizando técnicas Schlenk.

#### III.1.a. *Síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs)*

En primer lugar, se disuelve 1 g de CTAB en 480 mL de agua (grado HPLC) y 3.75 mL de NaOH (2 M). La mezcla se calienta a 80 °C y se agita a velocidad constante y estable. Después, se añade una disolución de 5 mL de tetraetilortosilicato (TEOS) y 1 mL de EtOH, gota a gota a una velocidad constante (0.43 mL/min) con ayuda de un inyector automático. La suspensión obtenida se agita durante 1 h a 80 °C. El surfactante se elimina mediante intercambio iónico con una disolución de nitrato de amonio (10 mg/mL) en etanol (95 %) a 65 °C durante toda la noche bajo agitación magnética. El proceso de extracción se repite durante 2 h con nueva disolución extractora y finalmente se lava el sólido con abundante agua, después con etanol y se seca el sólido a vacío (Figura III.1).

En el caso de los materiales que presentan un marcaje fluorescente, previamente a la adición del alcoxisilano, se dejan reaccionar 2.3 mg de isocianato de fluoresceína (FITC) en 0.5 mL de EtOH con 5 µL de (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES) en atmósfera inerte bajo agitación durante 2 h. Después, se mezcla esta reacción con la disolución de TEOS y EtOH y se dispone en el inyector automático para adicionarlo sobre la suspensión de CTAB. La formación de las nanopartículas y la extracción del surfactante se realizan del mismo modo que en el caso anterior.

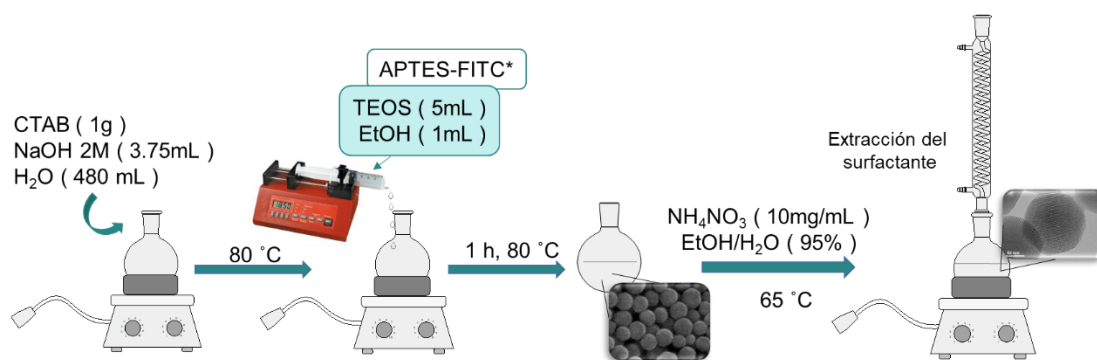


Figura III.1. Esquema de síntesis de las MSNs, en el caso de materiales fluorescentes se emplea una mezcla de alcoxisilanos (APTES-FITC y TEOS) como precursores de la sílice.

#### III.1.b. *Nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con grupos amino (MSNs-NH-NH<sub>2</sub>)*

Inicialmente, 200 mg de las MSNs sin surfactante se secan a vacío a 80 °C durante 2 h en oscuridad y posteriormente se dispersan en 50 mL de tolueno seco bajo atmosfera inerte. A

continuación, se adiciona bajo agitación vigorosa una disolución de [3-(2-aminoetilamino)propil]trimetoxisilano (TSD, 0.114 mL,  $0.516 \times 10^{-3}$  moles) en 5 mL de tolueno, y la reacción se mantiene a 110 °C durante toda la noche. Finalmente, el material se recupera mediante centrifugación y se lava varias veces con tolueno y etanol para finalmente secarlo a vacío.

### III.1.c. Nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con grupos ácido carboxílico en la superficie externa (**MSNs-COOH<sub>ext</sub>**)

Para la funcionalización externa de las **MSNs** se secan a vacío 1 g de dichas partículas, las cuales contienen todavía el surfactante en el interior de los poros, bajo agitación a 80 °C durante al menos 3 h en oscuridad. A continuación, se dispersan en 58 mL de tolueno seco en atmosfera inerte. Sobre esta suspensión se adiciona una disolución de anhídrido 3-(triethoxysilil)propilsuccínico (TESPSA, 145 g) en 15 mL de tolueno bajo agitación vigorosa y la reacción se mantiene a 110 °C durante toda la noche. Posteriormente, el material se recupera mediante centrifugación y se lava varias veces con tolueno y acetona, para finalmente, secarlo a vacío.

Tras la funcionalización se lleva a cabo la extracción del surfactante mediante intercambio iónico con una disolución de EtOH (360 mL), H<sub>2</sub>O (40 mL) y HCl (10 mL) bajo agitación magnética a 60 °C durante toda la noche. La extracción se repite durante 2 h con nueva disolución extractora y se lava el material con agua y EtOH. En este caso, la disolución extractora es acidificada con HCl con el fin de favorecer a la vez la extracción del surfactante y la apertura del anhídrido, consiguiendo en un paso el material final con grupos de ácidos carboxílicos en la superficie externa de las **MSNs**.

### III.1.d. Nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas covalentemente con proteínas

A continuación, se detallarán las síntesis de todos los materiales con proteína que se muestran en la presente Tesis Doctoral.

- Síntesis de materiales para vectorización (**MSNs-BSA** y **MSNs-Tf**):

En primer lugar, se emplean 820 mg de EDC·HCl (10 equivalentes por grupo nominal de -COOH) disueltos en agua para la activación de los grupos ácidos. Esta disolución se agrega sobre una suspensión dispersa de **MSNs-COOH<sub>ext</sub>** (0.4 g) en agua (150 mL, grado HPLC) bajo agitación vigorosa. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 h en oscuridad. El sólido se centrifuga y se lava para eliminar los residuos de EDC. A continuación, el material **MSNs-COOH<sub>ext</sub>** activado se dispersa en el tampón MES monohidratado (50 mM, pH en función de la proteína) bajo agitación. Después, cada proteína (BSA o Tf) se disuelve en el mismo

tampón MES 50 mM (pH 4.8 o pH 6.0, respectivamente) y se adiciona sobre la suspensión del material, para mantener la mezcla en agitación durante toda la noche en oscuridad. Finalmente, los materiales, denominados **MSNs-BSA** y **MSNs-Tf**, se aíslan mediante centrifugación, se lavan y se secan.

- Síntesis de materiales con proteínas inmunomoduladoras (**MSNs-Ag85B**, **MSNs-LprG**, **MSNs-LprA**):

En este caso, se emplean diferentes cantidades de material de partida, **MSNs-COOH<sub>ext</sub>** en función de la cantidad de proteína disponible para la obtención del material final. Tanto el procedimiento como la estequiometría de la reacción entre la proteína y los grupos ácidos se conserva en todos los casos con respecto al protocolo de síntesis comentado anteriormente en el caso de los materiales con BSA y Tf. Las cantidades específicas de cada uno de los reactivos, así como las condiciones de pH empleadas se detallan en la Tabla III-1.

*Tabla III-1. Cantidades de reactivos empleadas en las reacciones de anclaje covalente de las proteínas inmunomoduladoras.*

<b>Materiales finales</b>	<b>MSNs-COOH<sub>ext</sub> (g)</b>	<b>EDC.HCl (g)</b>	<b>Proteína (mg)</b>	<b>pH tampon MES</b>
MSNs-Ag85B	0.112	0.122	3.4	4.8
MSNs-LprG	0.261	0.286	5.6	6.7
MSNs-LprA	0.170	0.186	3.9	4.0

#### III.1.e. Nucleación de nanopartículas de plata sobre MSNs modificadas con grupos amino (**MSNs-AgNPs**)

En primer lugar, se evalúan distintas concentraciones (%p/v) de nitrato de plata como precursor inorgánico. Los porcentajes de concentración de dicho precursor que se han ensayado son 0.01, 0.1, 1, 1.25, 1.5% p/v, seleccionándose de estos la concentración con mejores resultados. Por otro lado, se ha realizado una evaluación de dos métodos de reducción: térmica y química. La reducción por vía térmica se realiza en pequeña cantidad en un horno con temperatura controlada bajo atmósfera de aire, así como, posteriormente, escalando las condiciones de dicha reducción, con mayor cantidad de muestra, bajo corriente de aire sintético en un horno tubular, con un programa de temperatura en base al empleado en el método a pequeña escala. En el caso de la reducción química se emplean distintos agentes reductores, como son, borohidruro sódico (NaBH<sub>4</sub>), una disolución de formaldehído en agua al 37%, ácido ascórbico y tampón HEPES.

La optimización de la cantidad de plata se lleva a cabo con distintas síntesis en donde 15 mg de **MSNs-NH-HN<sub>2</sub>** son dispersados en 1 mL de una disolución de AgNO<sub>3</sub> de concentraciones 0.01, 0.1, 1, 1.25, 1.5% p/v en H<sub>2</sub>O (grado HPLC). La mezcla de reacción se mantiene en agitación y en la oscuridad a temperatura ambiente durante toda la noche. El sólido se aísla mediante centrifugación (4000 g durante 20 minutos), se lava con agua y se seca. La reducción se lleva a cabo térmicamente a 600 °C (empleando una rampa de temperatura de 10 °C/min) durante 1 h bajo atmósfera de aire. Finalmente, tras el proceso de reducción de obtiene el material final **MSNs-AgNPs**, con diferentes cantidades de plata.

La reducción química de los iones Ag<sup>+</sup> se realiza mediante diferentes síntesis en paralelo con 30 mg de **MSNs-NH-HN<sub>2</sub>** dispersos en 2 mL de una disolución de AgNO<sub>3</sub> (1 % wt) en agua o etanol, en el caso de la reducción con ácido ascórbico y formaldehído al 37 % o NaBH<sub>4</sub>, respectivamente. La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente y en ausencia de luz. El sólido se aísla mediante centrifugación (4000 g, 20 minutos), se lava y se seca. La reducción química se lleva a cabo posteriormente en una dispersión del sólido obtenido previamente en 2.5 mL de agua o etanol, sobre el cual se adiciona el agente reductor diluido en 3.5 mL de agua o etanol en cada caso. La adición se realiza gota a gota y la mezcla se mantiene 1 h bajo agitación a temperatura ambiente. Finalmente, los materiales se aíslan mediante centrifugación, se lavan y se secan. La proporción de los reductores con respecto a los iones teóricamente estabilizados en las MSNs empleada en esta reacción es de 5 a 1.

En el caso de la reducción con HEPES el proceso de tratamiento del material con el precursor de iones plata es el mismo pero el agente reductor, HEPES, se adiciona en este caso directamente sin aislamiento previo del material intermedio. La proporción de HEPES empleada frente a los iones es de 10 a 1.

#### *III.1.f. Nucleación de nanopartículas de AgBr en MSNs modificadas (**MSNs-AgBrNPs**)*

El proceso de obtención de nanopartículas de bromuro de plata se ha llevado a cabo mediante un proceso de síntesis en un solo paso, en el cual se forman de forma simultánea las nanopartículas de AgBr y las MSNs (Figura III.2). Para ello, previamente se disuelve 0.3 g de CTAB en 110 mL de H<sub>2</sub>O y 1 mL de NaOH (2 M). La mezcla se calienta a 75 °C y se agita a velocidad constante y estable. Por otro lado, se disuelven 2 mL de TEOS en 10 mL de etanol y 8 mL de dicha mezcla se añaden, gota a gota a una velocidad constante (0.8 mL/min) mediante un inyector automático. Esta mezcla de reacción se deja reaccionar durante 15 min bajo agitación vigorosa para la formación de los núcleos de sílice mesoestructurada.

Paralelamente, se prepara una mezcla con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ , 0,06 g,  $3,53 \times 10^{-3}$  moles) en 10 mL de agua; sobre la cual se añade, tras 10 minutos de agitación, 0,5 mL ( $2,27 \times 10^{-3}$  moles) de [3-(2-aminoetilamino)propil]trimetoxisilano (TSD). Esta disolución resultante se adiciona a velocidad constante de 1,5 mL/min sobre la reacción que contiene CTAB y TEOS. Para finalizar la reacción se añade la disolución restante de TEOS a una velocidad de 0,8 mL/min, manteniéndose la mezcla final a 75 °C durante 2 h.

La reducción y formación de las nanopartículas se realiza mediante un tratamiento térmico tras el aislamiento y el lavado de las nanopartículas obtenidas. El proceso se lleva a cabo en un horno tubular a una temperatura final de 600 °C durante 3 h con una subida de la temperatura de 10 °C/min bajo corriente de aire continua. En dicho proceso térmico se produce la formación de las nanopartículas de AgBr, así como la calcinación del surfactante presente en el interior de los poros.

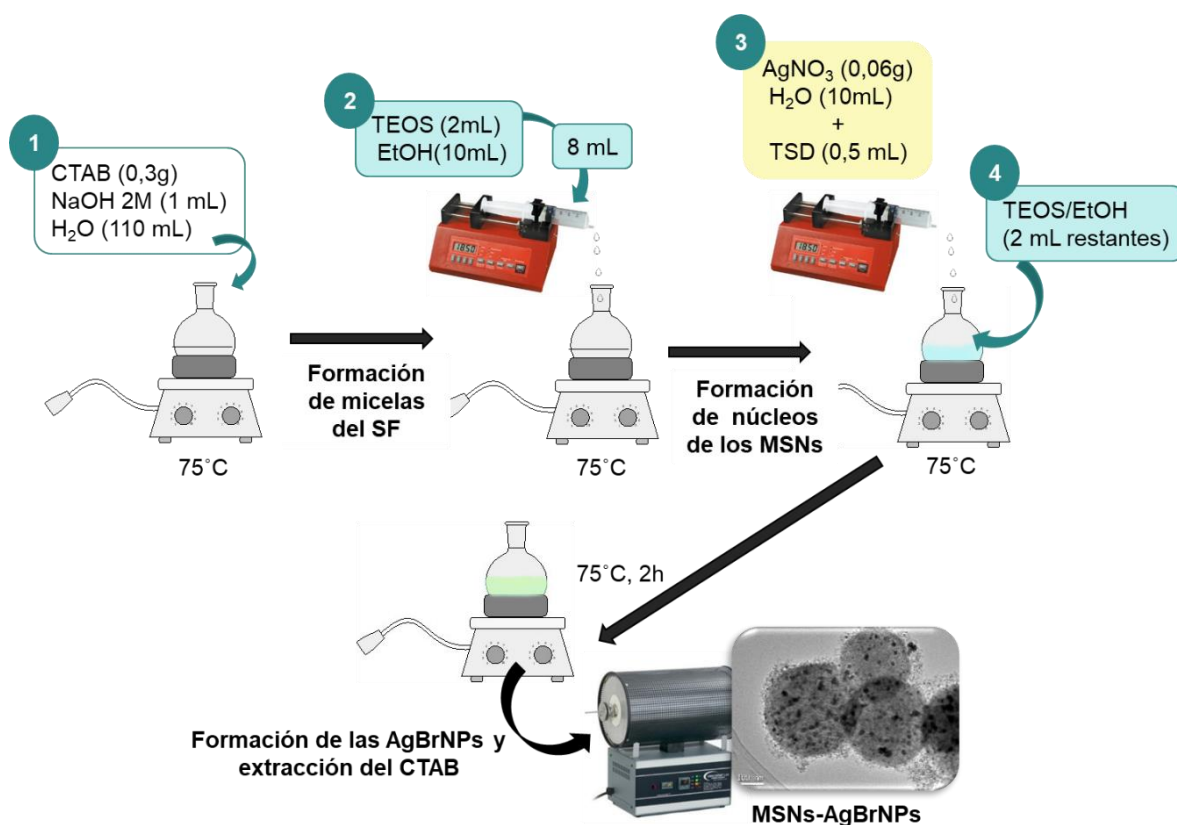


Figura III.2. Esquema de síntesis de MSNs modificadas con TSD y AgBrNPs.

#### III.1.g. Síntesis de nanomateriales núcleo@corteza ( $\text{Ag@MSNs}$ )

La síntesis de estos materiales se lleva a cabo en dos etapas. En primer lugar, la síntesis de las nanopartículas de plata que forman el núcleo de las partículas y en segundo lugar se forma la red mesoestructurada de sílice sobre el núcleo de la AgNPs.



La obtención de las AgNPs se realiza mediante la adición de 40 mL de CTAB 0.1 M en un matraz opaco con 10 mL de  $\text{AgNO}_3$  0.1 M a 30 °C bajo agitación vigorosa. Posteriormente se añaden 10 mL de  $\text{NaBH}_4$  0.2 M y la reacción se tiene bajo agitación a 30 °C y en ausencia de luz durante toda la noche. El recubrimiento con la capa de sílice mesoporosa alrededor de las AgNPs se realiza siguiendo el protocolo previamente descrito por Sanz-Ortiz y sus colaboradores,<sup>194</sup> cambiando las nanopartículas de oro por AgNPs. Bajo agitación y a 35 °C se mezclan 170 mL de CTAB 6 mM con 70 mL de etanol, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_3$ , 4 mL de las AgNPs previamente formadas y 200  $\mu\text{L}$  de TEOS. Cuando se agrega el TEOS, la temperatura se incrementa hasta 50 °C y se mantiene la reacción en la oscuridad durante la noche. Finalmente, las nanopartículas **Ag@MSNs-CTAB** se aíslan por centrifugación y se lavan sucesivas veces para eliminar el exceso de reactivos. La cantidad de la suspensión de AgNPs, así como la cantidad de TEOS se ha optimizado con el fin de obtener una síntesis homogénea de nanopartículas núcleo@corteza. Partiendo de las cantidades propuestas en la bibliografía para las nanopartículas de oro, se han probado cantidades por debajo y por encima de estas. A su vez se ha probado como afecta a la síntesis un aumento del doble de la cantidad de alcoxisilano precursor (TEOS) propuesta.

La extracción del surfactante (CTAB) se lleva a cabo mediante intercambio iónico utilizando una disolución extractora de 10 mg/mL de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en etanol (95 %). La mezcla se calienta a reflujo durante la noche y el sólido se lava con EtOH obteniéndose los materiales finales **Ag@MSNs**. También se llevó a cabo la calcinación del surfactante con el fin de evaluar otras rutas de eliminación del surfactante.

#### III.1.h. Nucleación de nanopartículas de plata sobre materiales funcionalizados con albumina de suero bovino (MSNs-BSA-AgNPs)

Tras el anclaje covalente de la BSA, la nucleación de nanopartículas de plata se lleva a cabo sobre una dispersión de **MSNs-BSA** (10 mg) en agua. Sobre ésta se añaden 5 mL ( $0.03 \times 10^{-3}$  moles) de nitrato de plata partiendo de una disolución 1 mg/mL. La mezcla se mantiene en agitación durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Tras el tiempo de reacción se añaden 2 mL de una disolución de ácido cítrico (5.77 mg/mL, 0.06 mmoles) como reductor en una proporción 1 : 2  $\text{Ag}^+$ : ácido cítrico. La reducción se mantiene en agitación mediante 16 h en la oscuridad a temperatura ambiente. La concentración final de  $\text{Ag}^+$  en la reacción es de 0.42 mg/mL. Los materiales finales se aíslan mediante centrifugación, se lavan y se secan.

#### *III.1.i. Nucleación de nanopartículas de plata sobre materiales funcionalizados con transferrina (MSNs-Tf-AgNPs)*

Partiendo de los materiales con transferrina anclada covalentemente se ha llevado a cabo la nucleación de nanopartículas de plata. En primer lugar, se realiza un proceso de síntesis homólogo al comentado en el caso de la BSA. Empleando una concentración inicial de nitrato de plata de 15 mg/mL y posteriormente reduciendo la cantidad a 1 mg/mL.

En este caso, la nucleación de las AgNPs requiere mayores pasos de optimización debido al mayor punto isoeléctrico de la Tf (pI 6.97) frente al de la BSA. Por ello, es necesario controlar el pH, mediante una disolución reguladora, a un valor superior al punto isoeléctrico. En este caso, se emplea una disolución reguladora de HEPES 20 mM a un pH 8.2 que favorece las interacciones electrostáticas y a su vez actúa como reductor de los iones plata.

En primer lugar, 25 mg de **MSNs-Tf** se dispersan en 12.5 mL de la disolución reguladora comentada anteriormente y se mantienen en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 25 mL de una disolución de 1 mg/mL de nitrato de plata en agua. La mezcla se mantiene en agitación durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Tras este tiempo la mezcla de reacción se diluye con 5 mL de agua bajo agitación, en oscuridad durante 16h. Los materiales finales se aíslan mediante centrifugación, se lavan y se secan.

La cantidad de AgNO<sub>3</sub> empleada en este caso, también, fue optimizada con el fin de obtener un material final homogéneo. En todos los casos se parte de una concentración inicial de 1 mg/mL pero se evalúan dos concentraciones finales (0.42 mg/mL y 0.59 mg/mL) para llegar a la óptima.

## III.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.2.a. *Nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs)*

Las MSNs, que sirven de base para la obtención de los distintos nanosistemas de la presente Tesis, se han sintetizado mediante el método Stöber modificado. Este método tiene lugar en condiciones básicas y alta dilución en una mezcla de alcohol y agua <sup>195</sup> permitiendo la obtención de partículas monodispersas y uniformes, de tamaño modulable mediante el control de parámetros como el pH, la temperatura de la reacción o el tiempo de la misma <sup>196-200</sup>.

En concreto, los materiales desarrollados a lo largo de la presente Tesis presentan una estructura de tipo MCM-41, los cuales pueden obtenerse mediante diversas condiciones de síntesis, aunque la más empleada es el uso de CTAB como surfactante y agente director de la estructura bajo condiciones básicas<sup>201,202</sup>. Generalmente, estos materiales presentan poros cilíndricos con un diámetro en torno a 1.5-3.5 nm y un área superficial igual o superior a 1000 m<sup>2</sup>/g (Figura III.3).

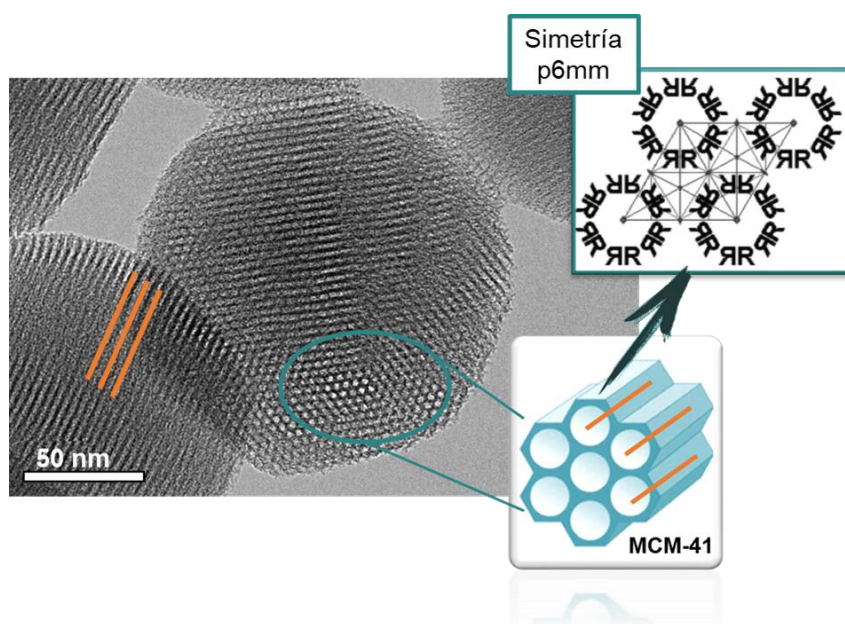
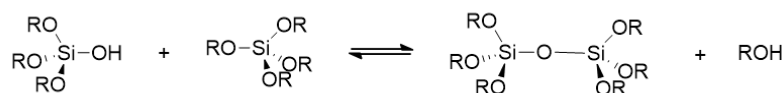
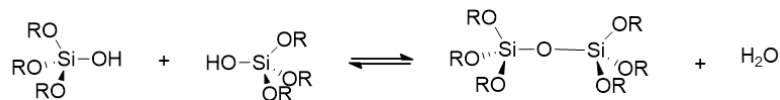
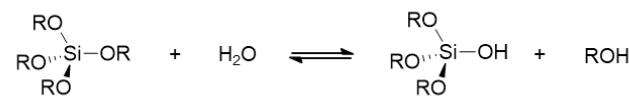


Figura III.3. Imagen de TEM y representación de la simetría hexagonal de los poros de las MSNs. Se muestra la orientación de los canales en vista frontal (estructura azul) y lateral (líneas naranjas).

El proceso de síntesis de las **MSNs** conlleva procesos de hidrólisis, condensación y polimerización de los precursores de tipo alcóxido, entre los cuales se ha seleccionado el tetraetilortosilicato (TEOS) como base de los nanosistemas desarrollados.

La hidrólisis de los precursores de sílice se inicia con un ataque nucleofílico de las moléculas de agua hacia el átomo de silicio, posteriormente un protón se transfiere al grupo

Generalmente, y debido a la inmiscibilidad de los alcoxisilanos en agua, la reacción suele iniciarse con una pequeña cantidad de alcohol como agente homogeneizador. Aunque, tal y como se observa en la síntesis, la generación de alcohol como subproducto en el proceso de hidrólisis y condensación permite la homogeneización total de la reacción sin necesidad de mayores cantidades de alcohol inicial. La síntesis finaliza con la polimerización de los dímeros, trímeros y tetrámeros de silicatos para formar la estructura polimérica (Figura III.4).



El mecanismo de formación de la estructura mesoporosa de estas nanopartículas puede describirse en base a las características de un modelo cristal-líquido.<sup>203</sup> De tal forma que se pueden considerar dos rutas diferentes: una en donde las moléculas del surfactante se

disponen dando lugar a una conformación hexagonal ordenada sobre la cual los precursores de sílice se organizan formando la nanopartícula <sup>204,205</sup>, que se denomina “True Liquid Crystal Template” (TLCT) y otra en la cual el proceso de ensamblaje es cooperativo <sup>206</sup> denominada “Cooperative Liquid Crystal Template” (CLCT) (Figura III.5).

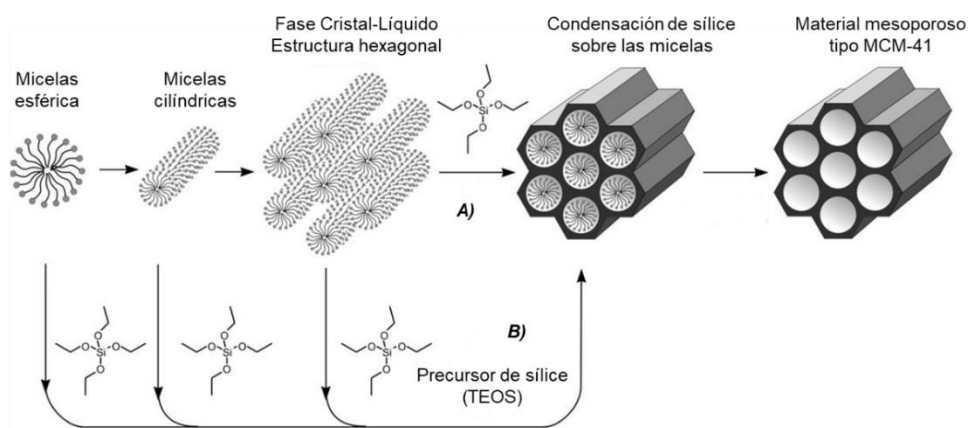


Figura III.5. Esquema del mecanismo de síntesis de materiales mesoporosos ordenados de sílice tipo MCM-41 mediante el modelo del cristal-líquido: A) “True Liquid Crystal Template” B) “Cooperative Liquid Crystal Template”

La mayoría de los materiales desarrollados presentan marcaje con un fluoróforo, el cual se introduce en la red de sílice mediante un proceso de co-condensación. Para ello se lleva a cabo previamente la modificación de la molécula fluorescente con un alcoxisilano que contiene un grupo amino, por el cual se produce la unión mediante la formación de un enlace tiourea (Figura III.6). Este marcaje será luego empleado para el seguimiento de los materiales en los ensayos *in vitro*.

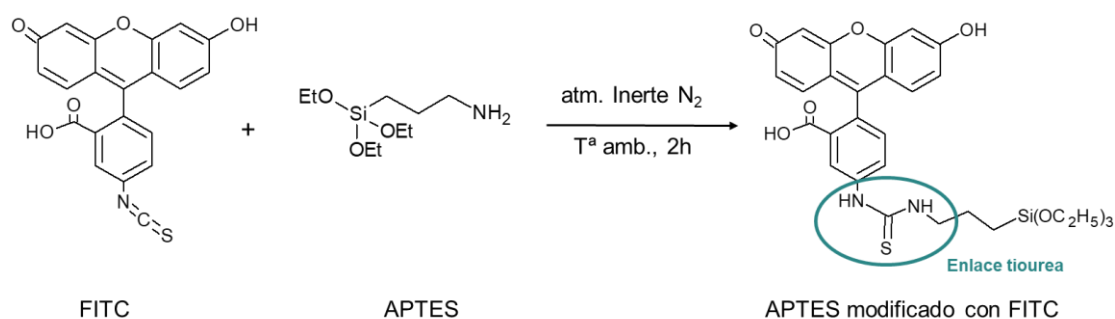


Figura III.6. Formación del enlace tiourea para la modificación del isocianato de fluoresceína con un alcoxisilano (APTES).

El proceso de co-condensación consiste en la adición de los grupos orgánicos, generalmente organosilanos de tipo  $(R'O)_3SiR$ , junto con los precursores de la sílice habituales (*i.e.*, TEOS) para la formación simultánea de la red de sílice y la funcionalización de ambas superficies, interna y externa. En este caso la incorporación de los grupos funcionalizantes no supone el bloqueo de los poros puesto que el surfactante se encuentra presente en la síntesis. Por el contrario, en este método la funcionalización no puede exceder del 40% para evitar la pérdida del orden (Figura III.7).

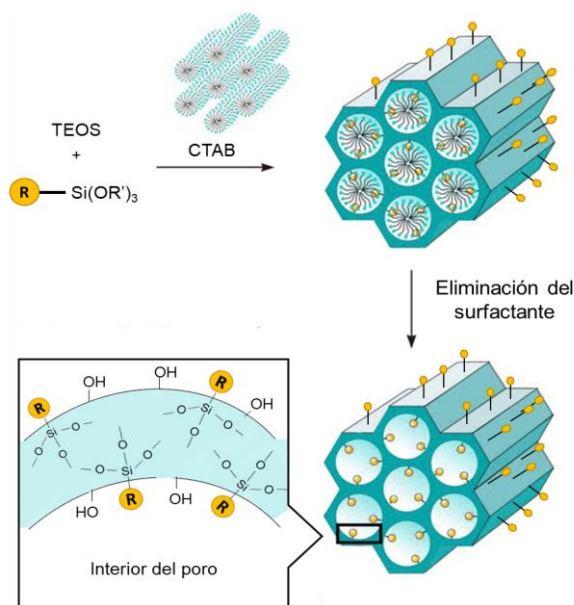


Figura III.7. Esquema de funcionalización por co-condensación o "one-pot" de los MSNs. Adaptada de referencia<sup>207</sup>.

Las nanopartículas obtenidas mediante la síntesis descrita fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM), donde se observa la forma esférica y uniforme de las mismas, con un diámetro medio de 150 nm (Figura III.8). Además, las micrografías de TEM permiten observar la red mesoporosa ordenada. El orden de los poros se confirma mediante la difracción de rayos X a bajos ángulos (Figura III.8 C), en donde se observa el patrón típico de los materiales con estructura MCM-41<sup>195</sup>, que presenta una simetría hexagonal 2D de tipo  $p6mm$  con un parámetro de celda unidad de 4.54 nm.

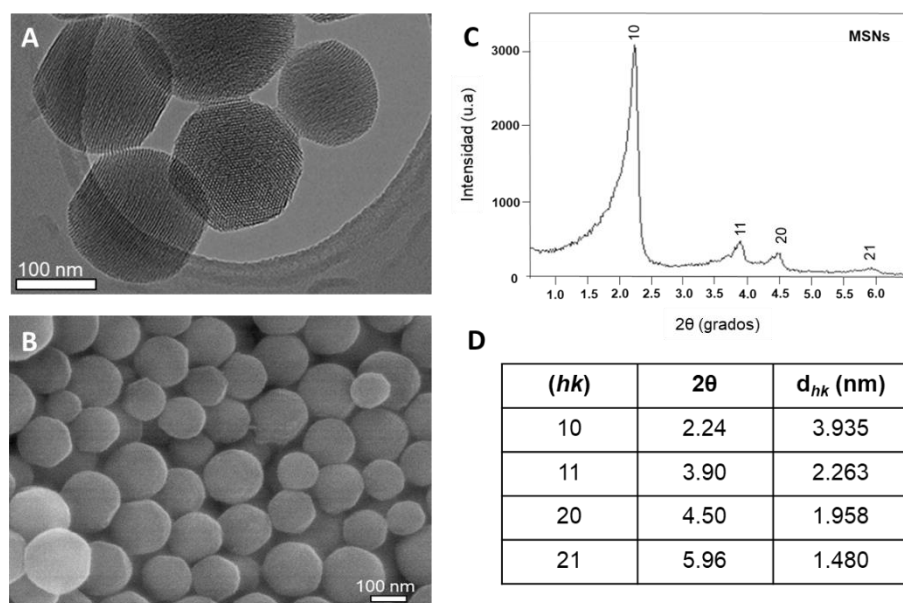


Figura III.8. Caracterización de las **MSNs** mediante TEM (A), SEM (B) y difracción de rayos X a bajo ángulo (C). Tabla de los máximos y los valores de  $d_{hk}$  obtenidos mediante DRX (D).

El parámetro de celda se calcula mediante la ecuación siguiente, obtenida teniendo en cuenta el plano con índices de Miller (10) y su correspondiente valor de distancia interplanar ( $d_{10}$ ) en función de la simetría hexagonal 2D:

$$a_0 = \frac{2\sqrt{3}}{3} d_{10}$$

La estructura mesoporosa y el diámetro de los poros se evalúa con también mediante porosimetría de adsorción de nitrógeno. La isoterma de adsorción obtenida para los materiales sin surfactante en el interior de los poros corresponde con las isotermas de tipo IV. Como se puede observar en las isotermas de la Figura III.9, la superficie específica de las **MSNs** calculada mediante el método BET varía en función del contenido de los poros. Las **MSNs** con surfactante presentan una superficie específica de 90.9 m<sup>2</sup>/g, con una isoterma característica de los materiales no porosos. Sin embargo, cuando se extrae el CTAB de la estructura se produce un aumento hasta los 1059.9 m<sup>2</sup>/g mostrando la isoterma de tipo IV. Se puede observar un salto abrupto de la isoterma en la región de presiones relativas intermedias que da información sobre la homogeneidad del diámetro de los canales cilíndricos. Tal y como se observa en la gráfica insertada en la Figura III.9, el máximo de la distribución obtenida mediante el método BJH se encuentra en 2.80 nm, lo que confirma la estructura mesoporosa de las partículas ya que este tamaño entra dentro del rango de los mesoporos (2-50 nm). El volumen de estos poros a un valor de  $P/P_0 = 0.6$  es de 0.854 cm<sup>3</sup>/g y el volumen total de los poros, tomado a presiones relativas mayores ( $P/P_0 = 0.99$ ), es de 0.946 cm<sup>3</sup>/g.



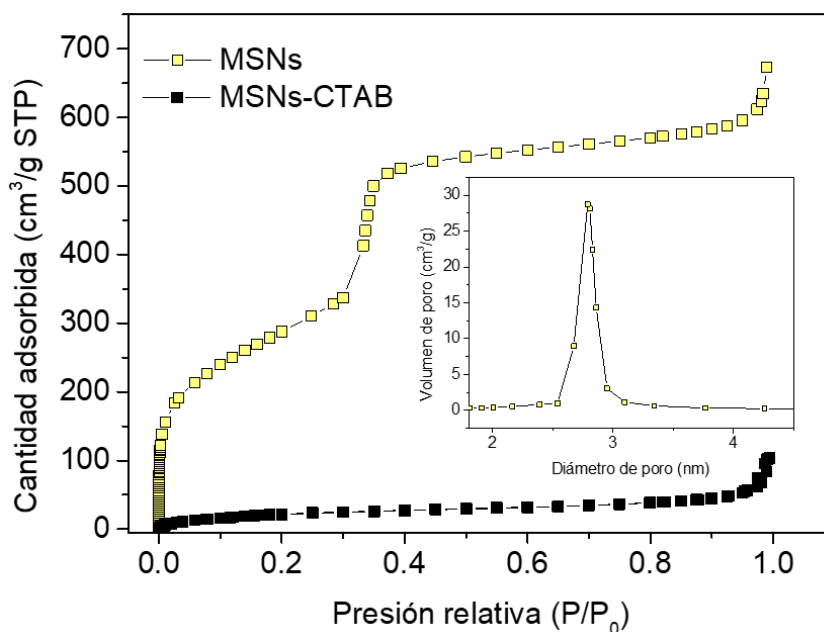


Figura III.9. Isotermas de adsorción de  $N_2$  de las **MSNs** con y sin surfactante en el interior de los poros. Distribución del tamaño de poros en las **MSNs** sin surfactante (figura insertada).

### III.2.b. Incorporación de nanopartículas inorgánicas sobre las MSNs

#### III.2.b.1. Optimización de síntesis de MSNs con nanopartículas de plata soportadas (**MSNs-AgNPs**).

Para la obtención de materiales mesoporosos con nanopartículas de plata se realiza un proceso de optimización de distintos parámetros que pueden influir en la obtención de los materiales finales. Como punto de partida, se evalúa la necesidad de la modificación de las MSNs de partida con grupos amino que sirvan para la complejación de los iones  $Ag^+$  previamente a la reducción y formación de las NPs metálicas.

La funcionalización con grupos amino se lleva a cabo mediante un proceso post-síntesis sobre el material extraído con el fin de llegar a modificar tanto la superficie externa como la interna del mismo. A modo general, este tipo de funcionalización consiste en la modificación de la superficie de la sílice una vez que la matriz de ésta ya está previamente formada (Figura III.10). Este proceso conlleva la reacción de organosilanos del tipo  $(R'O)_3SiR$  con grupos silanol libres en las superficies de los MSNs. Este método de funcionalización se puede emplear para la modificación total de la superficie interna y externa de la nanopartícula empleando un solo organosilano, como es el caso del material que se muestra en este apartado. A su vez esta vía ofrece la ventaja de conseguir funcionalizaciones asimétricas con grupos orgánicos diferentes en la superficie externa e interna de los poros y además la mesoestructura del material inicial no se ve afectada. Sin embargo, la distribución de los grupos orgánicos no es homogénea dentro



de la misma superficie y dependiendo de la naturaleza de dichos grupos pueden producirse reducciones en el tamaño de los poros llegando a un bloqueo de los mismos.

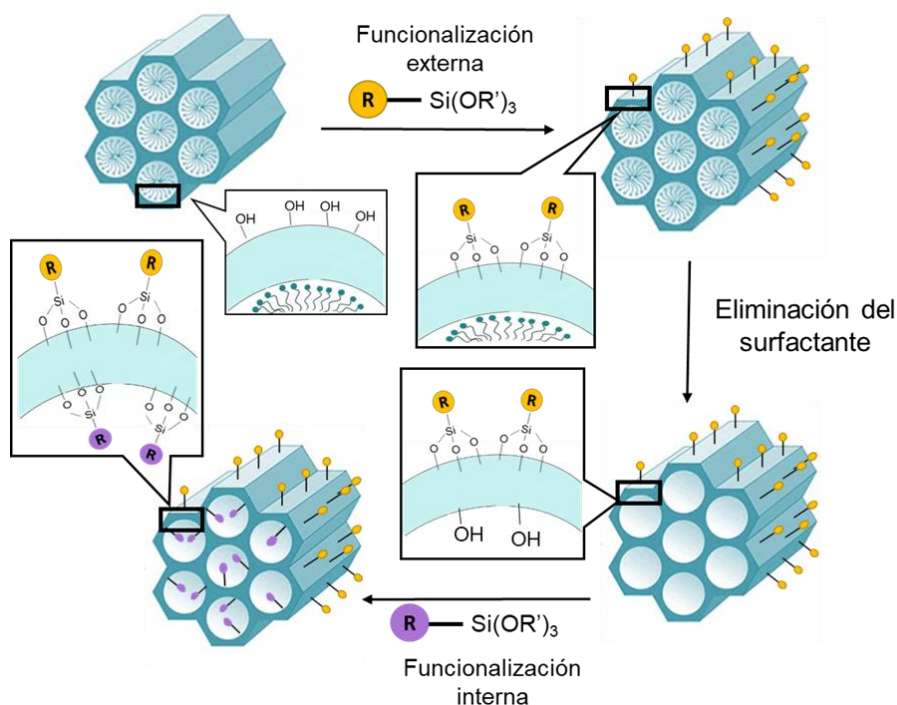


Figura III.10. Esquema de funcionalización post-síntesis o "grafting". Se muestra la posibilidad de funcionalizar asimétricamente la superficie externa o interna de los MSNs. Adaptada de referencia<sup>207</sup>

En base a esto, la cantidad de alcoxisilano requerida para la síntesis se determina para asegurar una completa funcionalización teniendo en cuenta la superficie específica del material empleado y una estequiometría de 3:1 en relación molar de Si-OH:R-Si-(OEt)<sub>3</sub>. Este proceso de funcionalización post-síntesis mediante co-condensación se muestra en la Figura III.11.

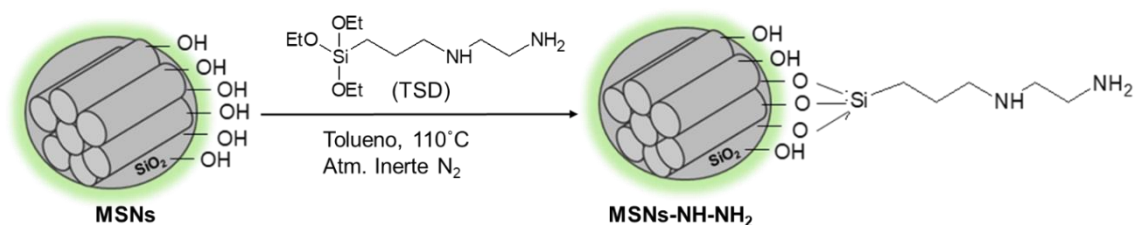


Figura III.11. Esquema de funcionalización de las MSNs con grupos amino tanto en la superficie externa como en la interna de los materiales.

Para dicho estudio se realizó un proceso de síntesis, con las mismas condiciones experimentales, pero empleando un material de partida con y sin funcionalización. La incorporación de los grupos amino sobre el material de partida se sigue mediante análisis termogravimétrico (TGA), en donde se observa como aumenta el % de materia orgánica con respecto al material inicial. Además, se confirma que ese aumento corresponde, a su vez, con un incremento del %N obtenido mediante análisis químico elemental, tal y como se muestra en la Tabla III-2.

Tabla III-2. Contenido de materia orgánica y análisis químico elemental de las **MSNs** y **MSNs-NH-NH<sub>2</sub>**.

Material	Contenido org. Teórico (wt%)	Contenido org. (wt%)	%C	%N
<b>MSNs</b>	-	6.02	3.64	0.05
<b>MSNs-NH-NH<sub>2</sub></b>	26.3	12.05 <sup>a</sup>	11.82	4.96

<sup>a</sup> El contenido orgánico (wt%) se determina mediante las pérdidas de masa por TGA, excluyendo las pérdidas debidas a la desorción de agua (> 125°C) y con las correcciones por las pérdidas de masa que corresponden con los alcoxisilanos que quedan sin condensar tras la reacción sol-gel (valor obtenido para el material MSNs sin funcionalizar y sin surfactante).

Según se puede observar en las micrografías electrónicas de los materiales finales (Figura III.12, arriba), si se emplea el material sin funcionalizar, se observan AgNPs preferencialmente libres y como población independiente de las MSNs. Por ello, y aunque se pueden observar **MSNs-AgNPs**, el producto final obtenido no es homogéneo. Sin embargo, la misma síntesis realizada con el material que presenta grupos amino para la complejación de los iones Ag<sup>+</sup>, da lugar a un producto homogéneo en donde se observan MSNs con AgNPs en su superficie y a modo general no se observan nanopartículas de plata libres.

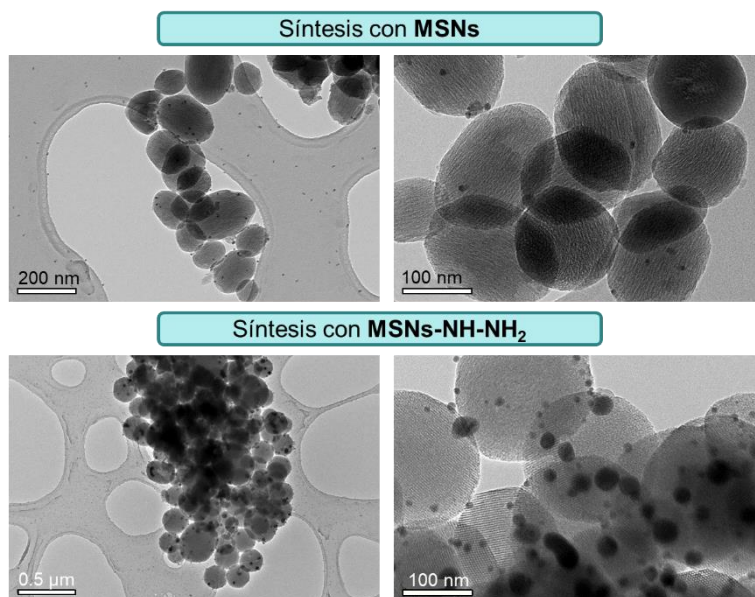


Figura III.12. Imágenes de TEM de los materiales obtenidos en la síntesis de **MSNs-AgNPs** con 1% de  $\text{AgNO}_3$  y reducción térmica empleando material sin funcionalizar (arriba) y funcionalizado con grupos amino (abajo).

La selección de las distintas concentraciones del precursor iónico, así como del método de reducción del mismo se ha realizado con el fin de optimizar la obtención de nanopartículas de diferentes tamaños y la diferente dispersión de las mismas en la red de sílice.

En base a los resultados obtenidos, las optimizaciones realizadas posteriormente se centran en el uso del material de partida que contiene grupos amino y modificaciones tanto en las cantidades del precursor iónico como del método de reducción. A modo general el esquema del proceso de síntesis se muestra en la Figura III.13.

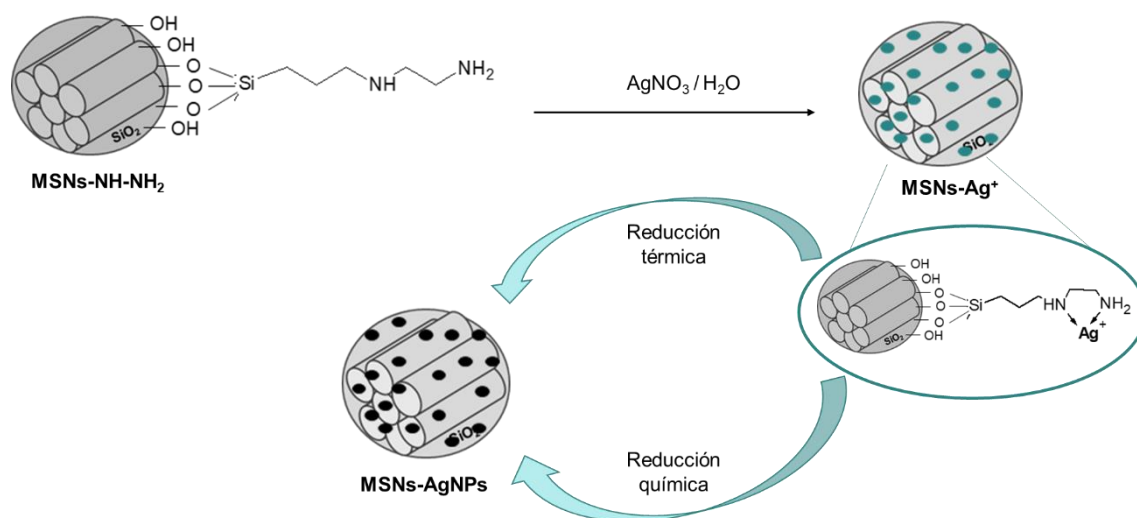


Figura III.13. Esquema de síntesis de los materiales **MSNs-AgNPs**.

En primer lugar, se tiene en cuenta la cantidad de grupos amino anclados, calculado a partir del porcentaje de materia orgánica del material final **MSNS-NH-NH<sub>2</sub>** (12.05%), el cual se obtiene a través del análisis termogravimétrico. Cabe destacar que en dicho porcentaje se ha eliminado la contribución de los grupos alcoxisilanos que no han condensado tras la reacción sol-gel de formación de las MSNs de tal forma que únicamente corresponde con los grupos anclados tras la funcionalización. En base a ese porcentaje y al peso molecular del residuo (R) que queda anclado en la superficie de las MSNs tras la funcionalización (Figura III.14) se calculan los moles de grupos amino presentes en la muestra.

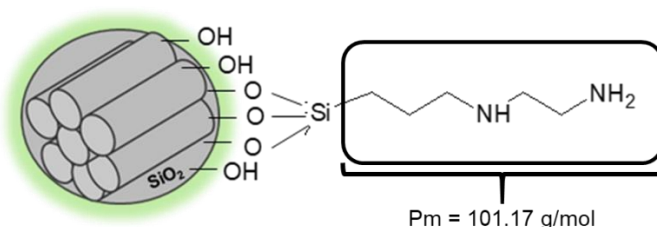


Figura III.14. Residuo orgánico (R) anclado tras la funcionalización con el reactivo TSD.

De tal forma que, el material empleado para la incorporación de AgNPs presenta  $1.19 \times 10^{-3}$  moles de R /g **MSNs-NH-NH<sub>2</sub>**, teniendo en cuenta que por cada molécula de residuo orgánico que se ancla tenemos 2 grupos amino que actúan para la complejación de iones Ag<sup>+</sup>.

Como se puede observar en las imágenes de TEM mostradas anteriormente (Figura III.12, abajo), aunque el producto obtenido es homogéneo, las AgNPs no presentan una distribución de tamaños homogéneos. Por ello, y sabiendo que la estequiometría de la complejación es de 1:1, se establecen diferentes reacciones con exceso o defecto de Ag<sup>+</sup> sobre dicha estequiometría para ver la influencia de la cantidad de precursor en los tamaños finales y la distribución de las AgNPs formadas. Así, las concentraciones evaluadas, su cantidad correspondiente de moles de ion Ag<sup>+</sup>/g **MSNs-NH-NH<sub>2</sub>** así como la cantidad con respecto a la relación estequiométrica 1:1 se muestran en la Tabla III-3.

Tabla III-3. Cantidades de ion plata por gramo de material MSNs-NH-NH<sub>2</sub>

w/v% de Ag <sup>+</sup>	Moles de Ag <sup>+</sup> /g MSNs-NH-NH <sub>2</sub>	Relación nominal Ag: R	Cantidad respecto a la relación 1:1
0.01%	3.91 x10 <sup>-5</sup>	0.03:1	Defecto con respecto a la relación estequiométrica 1:1
0.1%	3.91 x10 <sup>-4</sup>	0.3:1	
1%	3.91 x10 <sup>-3</sup>	3:1	Exceso con respecto a la relación estequiométrica 1:1
1.25%	4.90 x10 <sup>-3</sup>	4:1	
1.5%	5.89 x10 <sup>-3</sup>	5:1	

Según la caracterización de las distintas muestras obtenidas mediante TEM, se puede observar que cuando se reduce la cantidad del ion plata por debajo de la cantidad estequiométrica como ocurre en el caso de 0.01% (Figura III.15 A) y 0.1% (Figura III.15 B) se obtienen AgNPs de tamaño homogéneo, en torno a los 10 nm, sobre la superficie de las MSNs. Aunque se debe destacar que el aumento al 0.1% de Ag<sup>+</sup> supone la obtención de AgNPs libres dando lugar a muestras poco homogéneas. Por otro lado cuando la cantidad del precursor es superior a la cantidad estequiométrica como es el caso de 1% (Figura III.15 C), 1.25% (Figura III.15 D) y 1.5% (Figura III.15 E) se obtienen MSNs con AgNPs de diversos tamaños y mayor carga de AgNPs por MSNs debido al exceso de Ag<sup>+</sup> con respecto al residuo anclado en las MSNs que actúa como agente complejante. En este caso, ese exceso parece que no supone la nucleación de partículas libres, sino que favorece el crecimiento de las AgNPs, lo que asegura que dichas nanopartículas se originen soportadas sobre el material.

En base a los resultados obtenidos en las distintas variaciones, se puede concluir que la obtención de partículas de plata más homogénea sobre las MSNs se lleva a cabo empleando un 0.01% de AgNO<sub>3</sub>. La síntesis de las **MSNs-AgNPs** empleando dicha cantidad es reproducible a pequeña escala, permitiendo establecer una ruta optimizada para la obtención de este tipo de materiales.

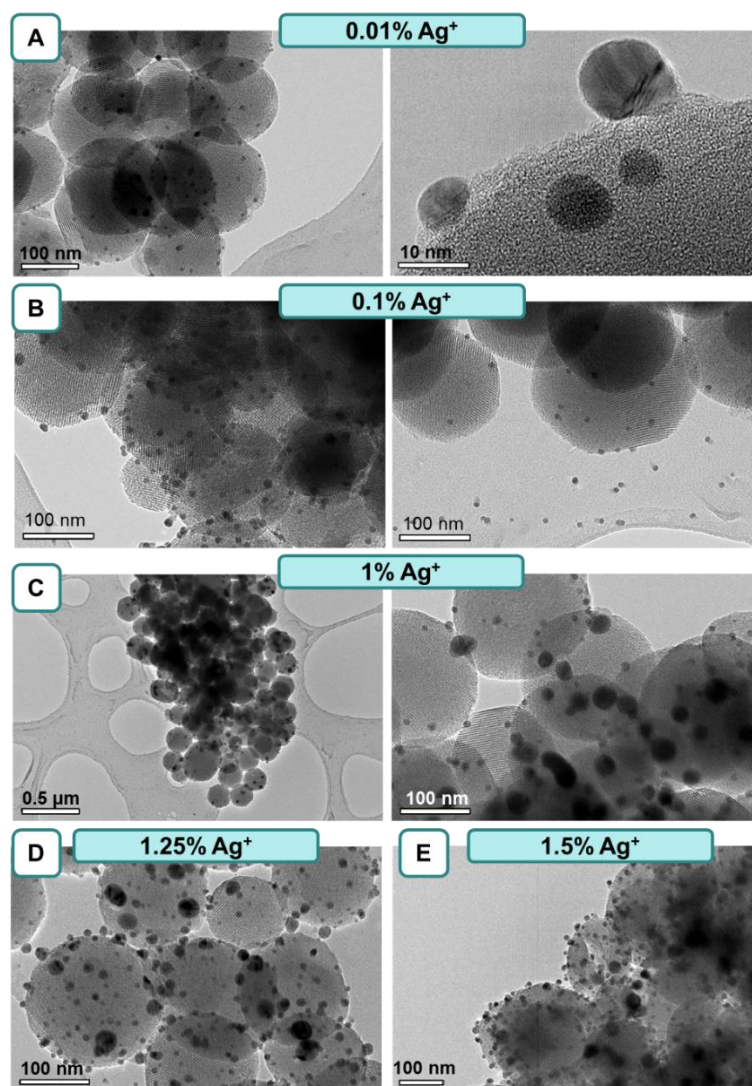


Figura III.15. Imágenes de TEM del proceso de optimización de la cantidad de precursor iónico para la obtención de *MSNs-AgNPs*.

Todas estas síntesis se basan en la reducción térmica a pequeña escala, pero, teniendo en cuenta estos materiales como base para la obtención de materiales híbridos con biomoléculas y nanopartículas de plata, este tipo de reducción supone un problema en el proceso de síntesis debido a que en la propia reducción se produce la calcinación de toda la materia orgánica presente en la muestra. Por ello, partiendo de la cantidad de plata optimizada previamente, 0.01% Ag<sup>+</sup>, se realizaron diferentes reducciones de los iones Ag<sup>+</sup> mediante agentes químicos, como el NaBH<sub>4</sub> (Figura III.16 A), ácido ascórbico (Figura III.16 B), formaldehído al 37% (Figura III.16 C) y HEPES (Figura III.16 D).

Como se observa en la Figura III.16, ninguno de los procesos de reducción química da lugar a buenos resultados para la síntesis de MSNs con AgNPs en su superficie. Se obtienen en todos los casos pequeñas partículas, pero solo algunas de las nanopartículas de sílice presentan AgNPs.



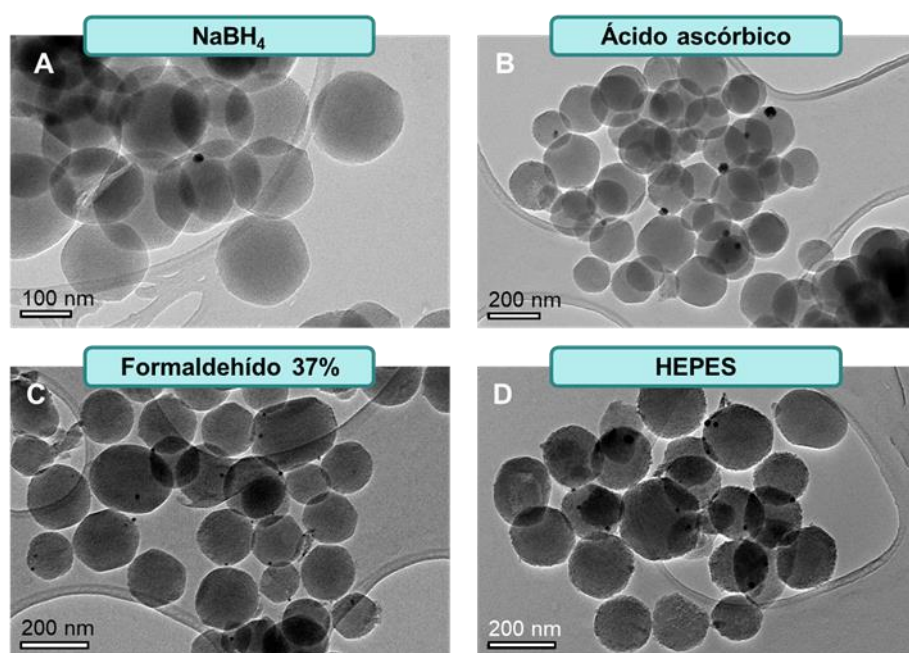


Figura III.16. Imágenes de TEM del proceso de optimización de la reducción química de los iones  $\text{Ag}^+$  para la obtención de AgNPs con  $\text{NaBH}_4$  (A), ácido ascórbico (B), formaldehído al 37% (C) o HEPES (D).

Conforme a estos resultados de reducción química, y en base a los obtenidos en el caso de la reducción térmica, la cual da lugar a productos más homogéneos y con mayor contenido de plata sin la necesidad de emplear elevadas cantidades del precursor de plata, se procede a estudiar la posibilidad de realizar la síntesis de las AgNPs mediante ese método de reducción y llevar a cabo la modificación de la superficie del material obtenido, **MSNs-AgNPs<sub>ext</sub>**, con biomoléculas posteriormente. Teniendo en cuenta esto y con el fin de obtener mayores cantidades del material **MSNs-AgNPs<sub>ext</sub>**, se procede a escalar la síntesis mediante el empleo de un horno tubular. En primer lugar, se emplea la misma metodología que se llevaba a cabo para la obtención en pequeñas cantidades. Sin embargo, la reducción térmica empleando un 0.01% de Ag, tal y como se había optimizado previamente a pequeña escala, no da lugar a un producto homogéneo. Como se observa en la Figura III.17, se obtienen porciones de muestra con AgNPs de pequeño tamaño soportadas en las MSNs (izquierda) junto con porciones de MSNs desnudas, sin AgNPs soportadas (derecha).

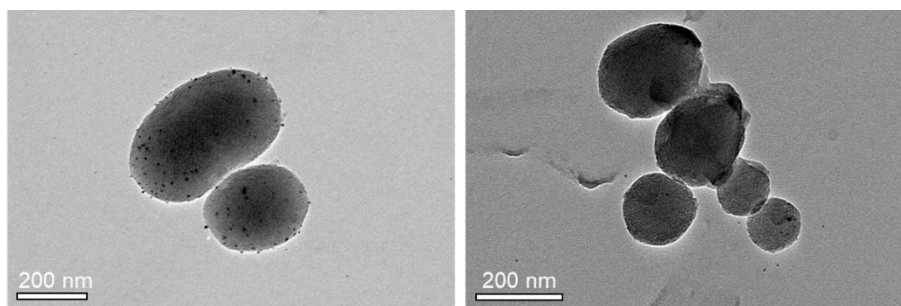


Figura III.17. Imágenes de TEM de los materiales obtenidos empleando un 0.01% de  $\text{AgNO}_3$  y reducción térmica en horno tubular.

Por ello, para el escalado de la reacción se aumenta la cantidad del precursor iónico de plata (1.5%) y se emplea una corriente de aire a flujo constante, con el fin de minimizar las variaciones entre las diferentes síntesis. En este caso, los productos obtenidos muestran MSNs con AgNPs de tamaños homogéneos y no existe tanta heterogeneidad en la muestra (Figura III.18).

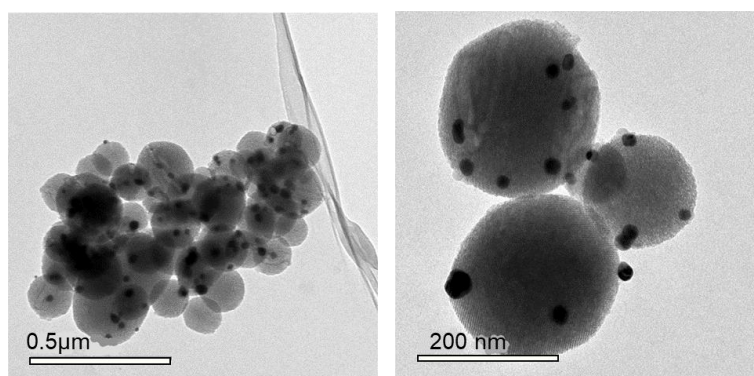


Figura III.18. Imágenes de TEM de las **MSNs-AgNPs<sub>ext</sub>** obtenidos a partir de un 1.5% de precursor iónico y reducción térmica en horno tubular con corriente de aire.

Una vez que el proceso a gran escala está optimizado y puesto que estos materiales serían la base para posteriores funcionalizaciones, se evalúan las modificaciones que pueden sufrir cuando son expuestos a procesos de suspensión en disolventes acuosos con agitación, simulando así, las reacciones posteriores que se llevarían a cabo para el anclaje de las proteínas. Los resultados de estos ensayos (Figura III.19) demuestran que las AgNPs deben sufrir procesos de oxidación y reducción lo que implica modificaciones en el tamaño y en la disposición de las mismas en la superficie de las MSNs. Se observa que las nanopartículas de diversos tamaños y dispersas en la superficie más externa de las MSNs (Figura III.19, izquierda), dan lugar a nanopartículas de plata de mayor tamaño consiguiendo mayor homogeneidad de tamaños (Figura III.19, derecha). Sin embargo, en base a los análisis de los porcentajes atómicos de los materiales mediante espectroscopía de energía dispersiva de



rayos X (EDS), se puede concluir que esas modificaciones no suponen pérdidas significativas del contenido total de plata, confirmando la propuesta de las variaciones debidas a procesos de oxidación-reducción, de tal forma que las partículas más pequeñas observadas antes del tratamiento dan lugar a la nucleación de partículas más grandes.

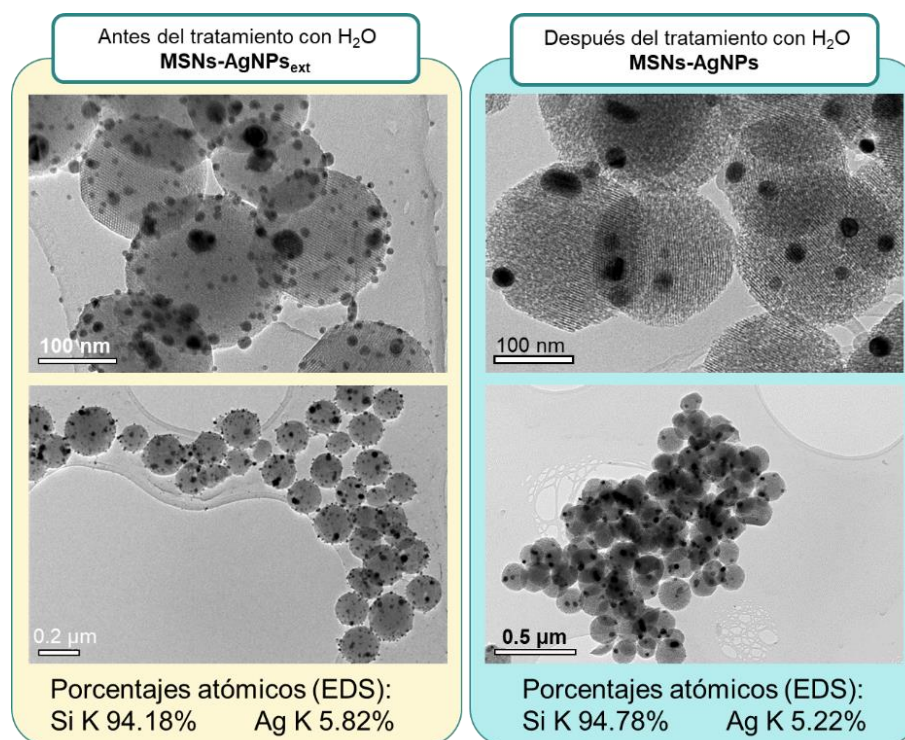


Figura III.19. Imágenes comparativas de TEM entre el material antes del tratamiento, **MSNs-AgNPs<sub>ext</sub>** (izquierda) y el material tras el tratamiento, **MSNs-AgNPs** (derecha). Valores de porcentajes atómicos correspondientes a cada uno de los materiales obtenidos mediante EDS.

Estos hechos dificultan los procesos de síntesis posteriores a la nucleación de las AgNPs, ya que se pierde el control en la distribución de tamaños de las partículas de Ag obtenidas, así como la homogeneidad de su distribución en el material final. Por todas estas razones, se mostrará posteriormente, otra estrategia para la obtención de materiales híbridos.

### III.2.b.2. Optimización de síntesis de MSNs con nanopartículas de bromuro de plata (**MSNs-AgBrNPs**).

La obtención de materiales con AgBrNPs se lleva a cabo mediante un proceso de una sola etapa en donde se produce la formación de las MSNs modificados con grupos amino, mediante co-condensación del TEOS y el reactivo TSD, así como la complejación de los iones Ag<sup>+</sup> y Br<sup>-</sup> para la formación de las nanopartículas. Tal y como se muestra en el esquema de

síntesis (Figura III.20), durante la reacción de co-condensación se encuentran presentes en el medio tanto el surfactante catiónico, CTAB, que contiene como contraion el bromuro, como los iones  $\text{Ag}^+$  que provienen del nitrato de plata. Por ello el material intermedio que se forma es el denominado **MSNs- $\text{Ag}^+ \text{X}^-$** , y que posteriormente da lugar al material con AgBrNPs.

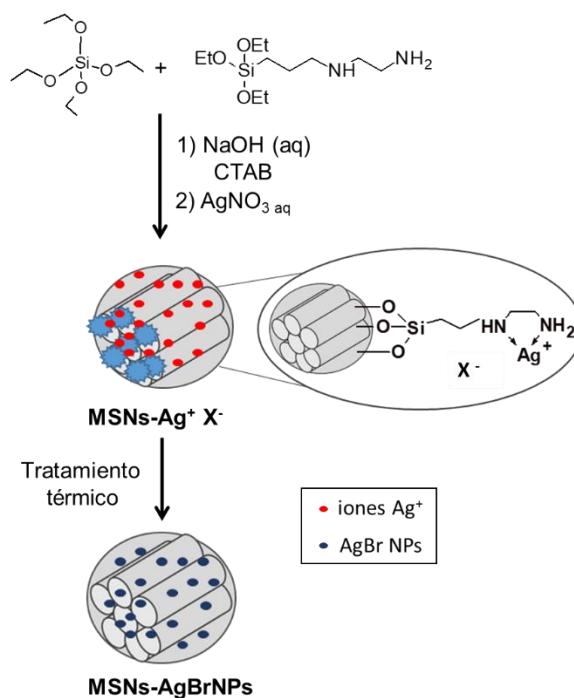


Figura III.20. Esquema de formación de las **MSNs-AgBrNPs**.

El proceso de obtención de las nanopartículas se lleva a cabo mediante dos rutas, con el fin de optimizar esta etapa. En primer lugar, se lleva a cabo un tratamiento similar al descrito previamente para la obtención de **MSNs-AgNPs**, en el cual se realiza un tratamiento químico como etapa final de la síntesis.<sup>124</sup> Según las imágenes de TEM, las MSNs obtenidas presentan pequeñas partículas soportadas en la superficie (Figura III.21 A y B). Aunque la proporción de estas nanopartículas con respecto a las MSNs es relativamente baja, por lo que no se obtienen un gran número de MSNs modificados. Sin embargo, los análisis por EDS muestran presencia de plata y de bromo corroborando que, en este caso, al coexistir ambos iones en el medio de reacción, se ve favorecido la formación de AgBrNPs. Estos resultados confirman que el método descrito previamente para la síntesis de **MSNs-AgNPs** conduce en realidad a la obtención de **MSNs-AgBrNPs**.

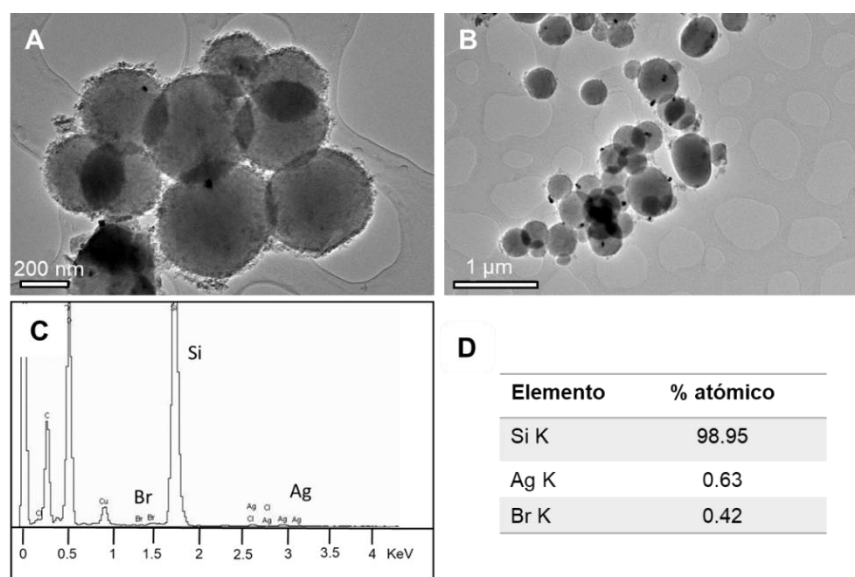


Figura III.21. Caracterización por TEM y EDS del material obtenido mediante tratamiento químico. Imágenes del TEM (A y B). Espectro EDS (C) y valores de % atómicos correspondientes al espectro EDS (D).

De forma semejante ocurre cuando el tratamiento es por vía térmica, en donde se observan MSNs con pequeñas NPs de AgBr (Figura III.22 A y B). Sin embargo, el contenido de AgBrNPs, en este caso, es superior corroborándose por el aumento del porcentaje atómico de plata (4.4% Ag, Figura III.22 C y D) que se observa en este material con respecto al obtenido mediante el tratamiento anterior (0.63% Ag, Figura III.21 C y D). Por ello, y en base a estos resultados obtenidos se selecciona el tratamiento térmico como proceso óptimo para la obtención del material **MSNs-AgBrNPs**. Además, este proceso ofrece como ventaja que en la propia etapa térmica se produce la formación de las nanopartículas así como la extracción del surfactante del interior de los poros de la red de sílice, etapa que en el caso del tratamiento químico tiene que realizarse tras la formación de las NPs, aumentando la complejidad del proceso de síntesis global.

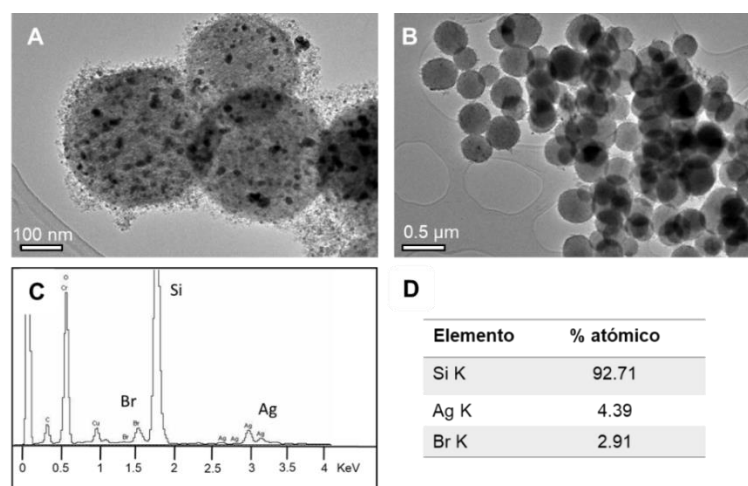


Figura III.22. Caracterización por TEM y EDS del material obtenido mediante vía térmica. Imágenes del TEM (A y B). Espectro EDS (C) y valores de % atómicos correspondientes al espectro EDS (D).

El proceso realizado por vía térmica fue realizado a pequeña escala por lo que, teniendo en cuenta esta ruta optimizada, se realiza un escalado de la síntesis empleando un horno tubular con corriente de aire para el control de la temperatura hasta los 600 °C durante 3 h, obteniendo resultados reproducibles con respecto a los obtenidos a pequeña escala. Las MSNs presentan NPs soportadas en la red de sílice de forma homogénea (Figura III.23 A y B) y los análisis obtenidos por EDS muestran la presencia de plata y bromo, con porcentajes atómicos similares a los citados anteriormente (Figura III.23 C y D).

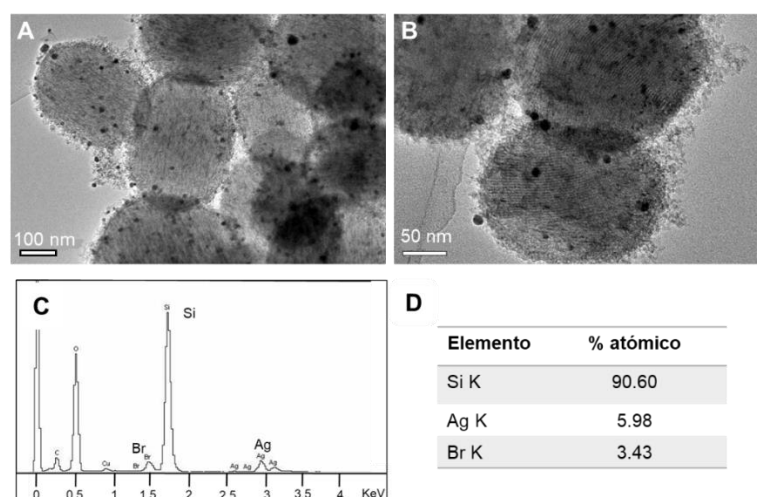


Figura III.23. Caracterización por TEM y EDS del material obtenido tras el tratamiento térmico en horno tubular. Imágenes del TEM (A y B). Espectro EDS (C) y valores de % atómicos correspondientes al espectro EDS (D).

## III.2.b.3. Optimización para la obtención de nanopartículas núcleo@corteza (Ag@MSNs)

La obtención de nanopartículas núcleo@corteza se lleva a cabo mediante una síntesis en dos etapas, descritas en la Figura III.24. En una primera etapa se sintetizan AgNPs que sirven como semilla para su recubrimiento con sílice mesoporosa en una segunda etapa, obteniéndose nanosistemas con estructura núcleo@corteza.

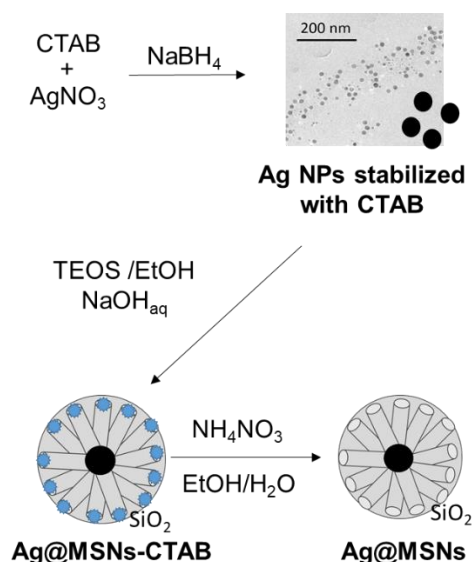
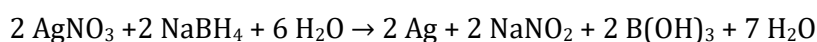


Figura III.24. Esquema de formación de las partículas núcleo@corteza Ag@MSNs.

Previamente un precursor de plata,  $\text{AgNO}_3$ , sufre un proceso de reducción mediado por  $\text{NaBH}_4$ , dando lugar a las nanopartículas de plata, mediante la reacción siguiente:



Las AgNPs obtenidas son caracterizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopia UV-visible. Las micrografías de dichas partículas muestran una dispersión homogénea de las mismas con un tamaño en torno a los 14 nm de diámetro (Figura III.25 A y D). El espectro de UV-visible (Figura III.25 C) muestra un máximo de absorción a 408 nm correspondiente con las nanopartículas de tamaño inferior a los 20 nm, confirmando el diámetro observado mediante microscopía. Posteriormente se realiza el recubrimiento de sílice, en esta etapa de síntesis se produce la hidrólisis y condensación del precursor alcoxisilano (TEOS) dando lugar a la red de sílice que crece en torno a las partículas de plata, las cuales se encuentran estabilizadas con CTAB. Este surfactante sirve a su vez como plantilla para la formación de la red mesoestructurada de la sílice. Las micrografías obtenidas mediante TEM muestran las partículas núcleo@corteza con un diámetro homogéneo en torno a los 77 nm (Figura III.25 B y D). Mediante el espectro de UV-visible se observa el desplazamiento del máximo a 421 nm, confirmando el recubrimiento (Figura III.25 C).

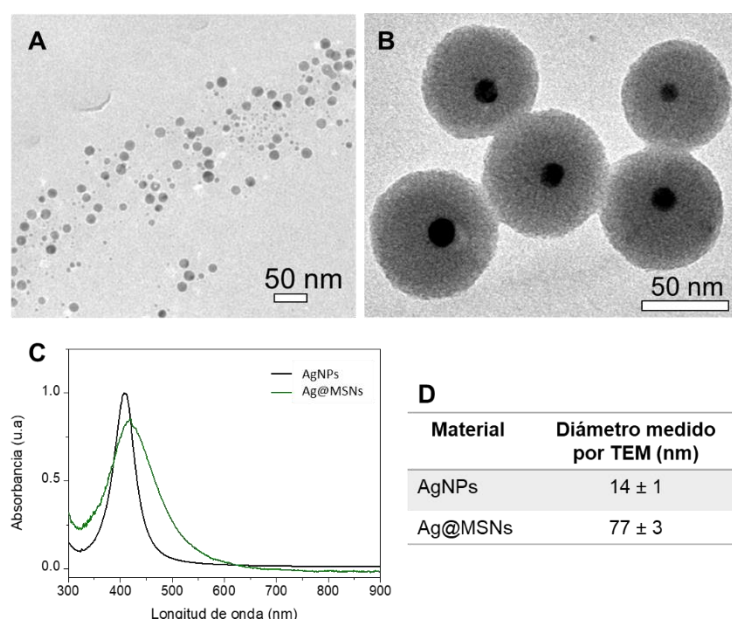


Figura III.25. Imágenes de TEM de las nanopartículas de Ag (A) y de las **Ag@MSNs** con CTAB (B). Espectros UV-visible de las AgNPs y las **Ag@MSNs** (C). Diámetro de partícula obtenido mediante las micrografías de TEM (D).

Para la obtención del material final **Ag@MSNs** se realiza previamente una optimización del proceso de síntesis, con el fin de obtener partículas núcleo@corteza homogéneas sin la existencia de AgNPs sin recubrimiento o viceversa. En primer lugar, se llevan a cabo distintas síntesis en donde se varía la cantidad y concentración de las AgNPs, obtenidas previamente, manteniendo constante la concentración del precursor de sílice. Las cantidades evaluadas son 2.5 mL, 5 mL y 10 mL de las AgNPs preparadas previamente, de tal forma que la concentración final de AgNPs va en aumento para la misma concentración del precursor de sílice. Como se puede observar en las imágenes de las caracterizaciones por TEM, en cada reacción se muestran diferencias entre los materiales finales obtenidos. En el primer caso (Figura III.26 A) la dispersión final de nanopartículas presenta **Ag@MSNs** pero también nanopartículas compuestas únicamente por la sílice, indicando la necesidad de mayor cantidad y concentración de AgNPs para la obtención de una única población de partículas núcleo@corteza. La segunda reacción, en donde la cantidad de AgNPs es el doble de la anterior y por lo tanto aumenta su concentración, muestra una población mucho más homogénea, sin embargo, aún se observa alguna partícula de sílice sin el núcleo de plata o incluso algunas que presentan doble núcleo (Figura III.26 B). La última síntesis, llevada a cabo con el cuádruple de cantidad y concentración de AgNPs que la inicial, muestra regiones de **Ag@MSNs** similares a las encontradas en la muestra anterior (Figura III.26 C1), pero sin embargo también se encuentran cúmulos de AgNPs sin recubrimiento (Figura III.26 C2), dando idea de la heterogeneidad del producto de reacción.



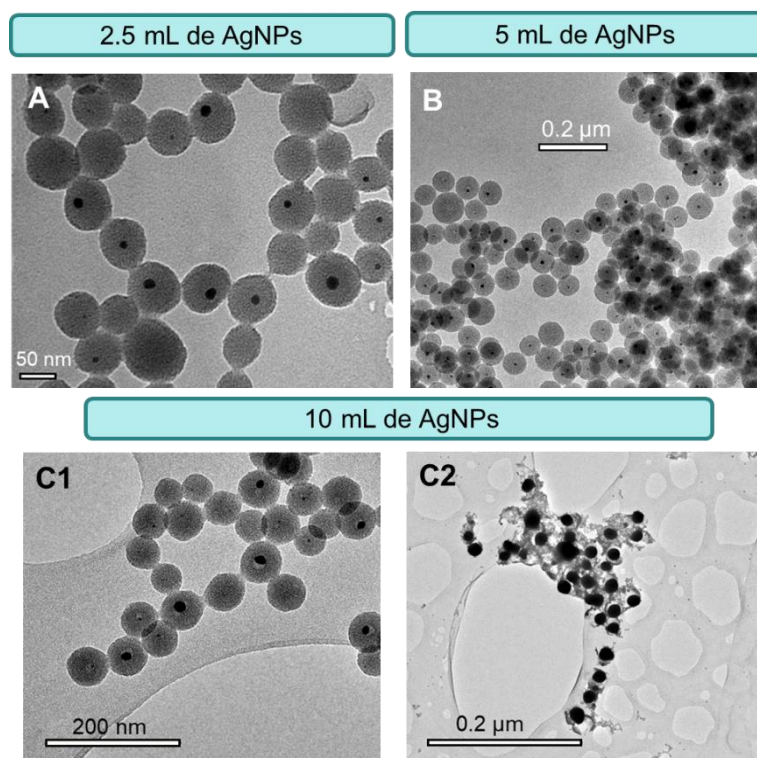


Figura III.26. Imágenes de TEM del proceso de optimización de la cantidad de AgNPs empleadas en la síntesis de las **Ag@MSNs**. Síntesis con 2.5 mL (A), 5 mL (B) y 10 mL (C1-2).

En base a estos resultados, se puede considerar que el empleo de una cantidad y concentración intermedia de AgNPs (5 mL) da lugar a los mejores resultados en cuanto a homogeneidad de la muestra. Sin embargo, la síntesis no ofrece un 100 % de nanopartículas núcleo@corteza puesto que se pueden observar partículas compuestas únicamente con sílice. Por ello, se decide realizar una síntesis con la concentración de AgNPs optimizada, pero reduciendo la concentración del alcoxisilano precursor, TEOS. En este caso, se emplea la mitad de la concentración utilizada en los casos anteriores, observándose partículas núcleo@corteza (Figura III.27 A) bien dispersas y de tamaños homogéneos, pero a su vez se puede comprobar que se trata de un producto heterogéneo ya que existe otra población de nanopartículas de plata libres (Figura III.27 B), debido probablemente a un exceso de las mismas en proporción al precursor de sílice.

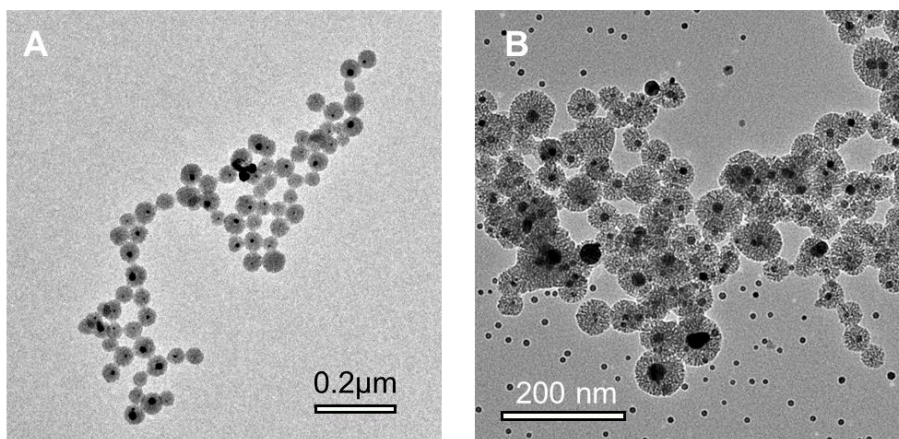


Figura III.27. Imágenes de TEM de la síntesis con mitad de cantidad de TEOS. **Ag@MSNs** (A) y población heterogénea con AgNPs libres (B).

Según todo el proceso de optimización, finalmente, se considera que una reducción de la concentración del precursor de sílice no evita los problemas de heterogeneidad que se encontraban en los materiales obtenidos con una cantidad y concentración intermedia de AgNPs, por lo que las condiciones óptimas suponen fijar la cantidad de TEOS en 200  $\mu$ L, empleados en todo el proceso de variación de la cantidad de AgNPs, y reducir en cierta medida la cantidad de estas nanopartículas, utilizando finalmente 4 mL de AgNPs y reduciendo así la concentración final de las mismas.

La extracción del surfactante se lleva a cabo mediante dos rutas diferentes. La primera de ellas se basa en un tratamiento térmico permitiendo la calcinación de toda la materia orgánica presente en la muestra. Sin embargo este proceso afecta a la integridad de los materiales finales ya que las partículas pierden su configuración núcleo@corteza (Figura III.28 B). Esto es debido probablemente a que las AgNPs del núcleo sufren procesos de oxidación y reducción dando lugar de nuevo a las nanopartículas pero como una especie libre y aislada de la red de sílice. Como ruta alternativa, el surfactante se extrae mediante el uso de una disolución extractora que contiene EtOH y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Este proceso permite obtener los materiales intactos con los poros libres de surfactante (Figura III.28 C). Por lo que finalmente se selecciona este último método de extracción como el óptimo para las sucesivas preparaciones.



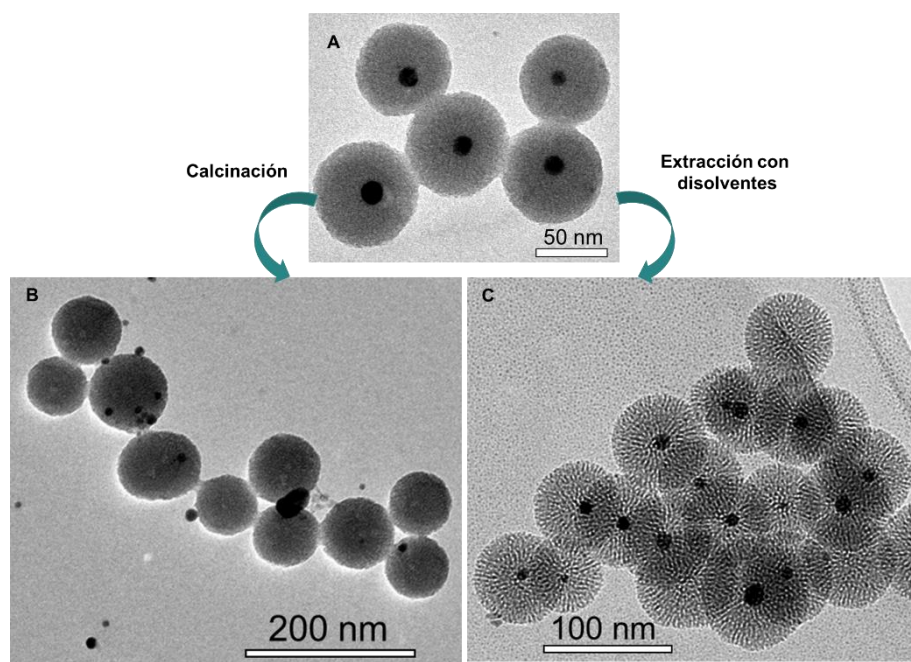


Figura III.28. Imágenes de TEM del material **Ag@MSNs** con surfactante en los poros (A) y tras la extracción por calcinación (B) o mediante el uso de disolventes (C).

#### III.2.b.4. Comparación de las características químicas y estructurales de los distintos materiales de sílice con NPs de Ag.

Tras la optimización de los distintos procesos de síntesis, los materiales finales son caracterizados mediante diferentes técnicas. En primer lugar, la caracterización de los materiales **MSNs-AgNPs**, **MSNs-AgBrNPs** y **Ag@MSNs** mediante TEM permite comparar visualmente la morfología y la estructura ordenada de la red porosa de la sílice y los análisis de EDS muestran una comparativa clara del contenido medio, a través de porcentajes atómicos, de los elementos Si, Ag y Br.

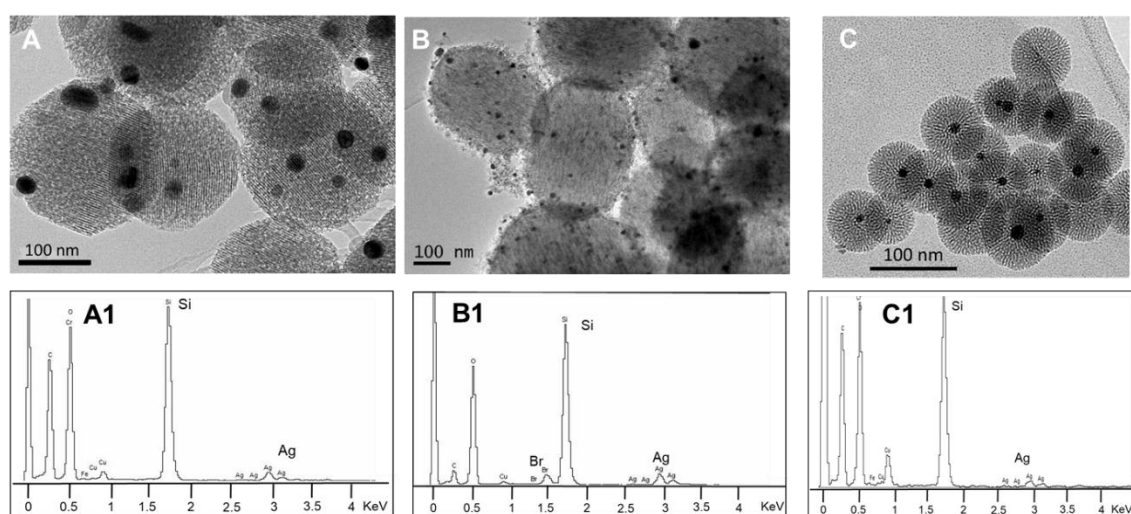


Figura III.29. Imágenes de TEM y espectros de análisis por EDS de los materiales: **MSNs-AgNPs** (A-A1), **MSNs-AgBrNPs** (B-B1) y **Ag@MSNs** (C-C1).

Según muestra la Figura III.29, se puede observar que los tres materiales presentan una red de poros ordenada. En el caso del material **MSNs-AgNPs** (Figura III.29 A), las AgNPs se encuentran soportadas sobre la estructura de las MSNs, sin observar AgNPs libres, y éstas presentan, además, tamaños homogéneos ( $24 \pm 4$  nm). El material **MSNs-AgBrNPs** (Figura III.29 B) presenta nanopartículas de menor tamaño ( $12 \pm 6$  nm) que en el caso anterior, pero igualmente soportadas sobre las MSNs dando lugar a un producto homogéneo. Las micrográficas del material **Ag@MSNs** (Figura III.29 C) muestra homogeneidad de tamaños de las AgNPs que conforman el núcleo de las partículas ( $10 \pm 2$  nm) y la red de sílice presenta un ordenamiento radial a diferencia de los materiales anteriores.

Los espectros EDS muestran como en los materiales **MSNs-AgNPs** (Figura III.29 A1) y **Ag@MSNs** (Figura III.29 C1), solo se observa señal correspondiente al Si y a la Ag, y sin embargo en el material **MSNs-AgBrNPs** (Figura III.29 B1) aparece, a su vez, la señal del Br. Estos resultados se ven reflejados también en los valores de porcentajes atómicos (Tabla III-4) en donde se puede ver la comparación del contenido de Ag y Br de cada uno de los materiales. En primer lugar, se puede destacar, que, tal y como se comentó previamente, el material **MSNs-AgNPs<sub>ext</sub>** no sufre pérdidas significativas en el contenido de plata tras un tratamiento en agua. De tal forma que el material final **MSNs-AgNPs** presenta un porcentaje similar al del material predecesor, pero cambios a nivel de tamaño y distribución de las partículas de plata. Además, comparando este material con **MSNs-AgBrNPs** y **Ag@MSNs** se puede confirmar que el contenido de plata es superior en este caso. Los otros dos materiales, **MSNs-AgBrNPs** y **Ag@MSNs**, presentan porcentajes similares de Ag, con la diferencia de que en el caso del material **MSNs-AgBrNPs**, el contenido de Br es significativo corroborando que las nanopartículas inorgánicas que presenta este material son de AgBr. El bajo contenido de Br en el material **Ag@MSNs**, puede deberse en parte a residuos del surfactante, empleado en la estabilización de las AgNPs y posteriormente como agente director de la estructura de la red de sílice, que contiene como contraion Br<sup>-</sup>.

Tabla III-4. Análisis de espectroscopia de energía dispersiva de rayos-X. Porcentajes atómicos de Si, Ag y Br para los materiales *MSNs-AgNPs<sub>ext</sub>*, *MSNs-AgNPs*, *MSNs-AgBrNPs* y *Ag@MSNs*.

Materiales	Si K	Ag K	Br K
<b>MSNs-AgNPs<sub>ext</sub></b>	94.18	5.82	--
<b>MSNs-AgNPs</b>	94.78	5.22	--
<b>MSNs-AgBrNPs</b>	95.33	3.02	1.65
<b>Ag@MSNs</b>	96.46	3.30	0.24

El estudio de los patrones de difracción de rayos X a bajo ángulo permite confirmar el ordenamiento de la red de poros en los diferentes materiales. Como se observa en la Figura III.30, el material base, **MSNs**, presenta el patrón característico de la simetría hexagonal  $p6mm$  correspondiente a la estructura MCM-41. Este patrón muestra 4 máximos que corresponden con los planos (10), (11), (20) y (21). La funcionalización de la superficie de este material con un alcóxido de silicio que contiene grupos amino, dando lugar al material **MSNs-NH-NH<sub>2</sub>**, no supone una variación en el patrón de DRX y los valores de  $2\theta$ , así como la distancia interplanar ( $d_{10}$ ) tampoco se ven afectados (Tabla III-5). Sin embargo, tal y como se observa en la Tabla III-5 y Figura III.30, la incorporación de AgNPs supone un ligero desplazamiento del máximo de difracción correspondiente al plano (10) de la estructura hexagonal  $p6mm$  y una disminución de la distancia interplanar. Aun así, en el patrón de DRX de dicho material, **MSNs-AgNPs**, no solo se observa el máximo de reflexión (10) sino que también se muestran ligeramente los máximos correspondientes a los planos (11) y (20), por lo que se puede confirmar que este material sigue presentando la simetría hexagonal  $p6mm$ . Si nos centramos en el material **MSNs-AgBr** se puede observar el mismo patrón con los máximos correspondientes a los planos (10), (11) y (20) pero, al igual que en el caso del material anterior, la presencia de las nanopartículas inorgánicas hace que los máximos estén desplazados y la distancia interplanar sea menor que los materiales mesoporosos de sílice sin modificar (Tabla III-5).

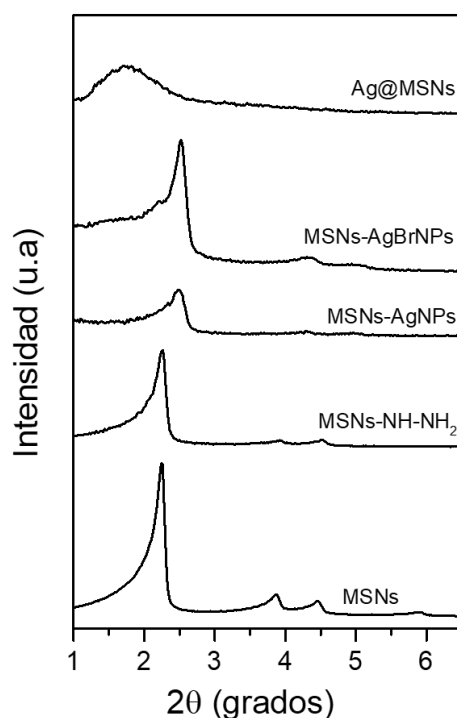


Figura III.30. Patrones de difracción de rayos-X de bajo ángulo de los materiales modificados y sin modificar.

El material **Ag@MSNs** muestra, sin embargo, un patrón de difracción muy diferente en comparación con los comentados anteriormente (Tabla III-5). Únicamente se observa un máximo ancho a un valor de  $2\theta$  muy inferior con respecto al resto de materiales, conllevando a su vez una expansión de la distancia interplanar. Estos resultados confirman la presencia de una estructura mesoporosa ordenada, tal y como se puede observar también en las imágenes de TEM (Figura III.29 C), aunque las variaciones de los parámetros de la red confirman la estructura de poros radiales observada previamente en estos materiales.

Tabla III-5. Valores de los ángulos para el máximo de difracción de DRX (10) para la estructura mesoporosa y sus correspondientes distancias interplanares  $d_{10}$ .

Material	$2\theta$ (°)	$d_{10}$ (nm)
<b>MSNs</b>	2.25	3.928
<b>MSNs-NH-NH<sub>2</sub></b>	2.25	3.916
<b>MSNs-AgNPs</b>	2.49	3.547
<b>MSNs-AgBrNPs</b>	2.51	3.505
<b>Ag@MSNs</b>	1.77	4.963

Si los estudios de difracción de rayos-X se realizan a altos ángulos se puede conocer, además, la naturaleza de las partículas inorgánicas que presentan cada uno de los materiales. En la Figura III.31 se pueden observar las diferencias en los difractogramas que muestran un patrón similar en el caso de los materiales **MSNs-AgNPs** y **Ag@MSNs**, correspondiente al patrón indexado de AgNPs con estructura cúbica centrada en las caras (JCPDS, No.4-0783). Sin embargo, el material **MSNs-AgBrNPs** presenta un patrón diferente que corresponde con la estructura cúbica del AgBr (JCPDS, No. 06-0438).

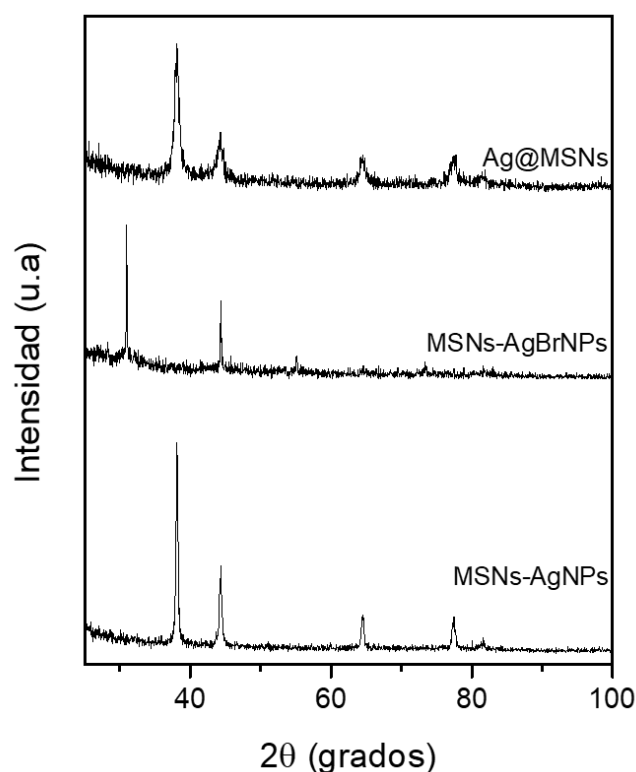


Figura III.31. Patrones de difracción de rayos-X a alto ángulo de los materiales finales **MSNs-AgNPs**, **MSNs-AgBrNPs** and **Ag@MSNs**. *MSNs-AgNPs difractograma (x1/2)*

Los valores de los máximos de cada uno de los difractogramas, correspondientes a los diferentes materiales, se muestran en la Tabla III-6. Estos resultados permiten confirmar la presencia de nanopartículas de  $\text{Ag}^0$  con estructura cristalina en los materiales **MSNs-AgNPs** y **Ag@MSNs** así como, la existencia de nanopartículas de AgBr, como única especie, en el caso del material **MSNs-AgBrNPs**. La ausencia de máximos de impurezas cristalinas ha permitido una correlación perfecta de los máximos experimentales con los indexados en la bibliografía. Este hecho, junto con el patrón de intensidades de dichos máximos, demuestra, en todos los casos, que las estructuras inorgánicas presentes en los materiales son puras.

Tabla III-6. Identificación de los planos (hkl) de los máximos observados en los patrones de DRX y sus correspondientes valores de  $d_{hkl}$ .

Material	(hkl)	2 $\theta$ (°)	$d_{hkl}$ (nm)
<b>MSNs-AgNPs</b>	111	38.12	0.235
	200	44.33	0.204
	220	64.49	0.144
	311	77.46	0.123
	222	81.66	0.117
<b>Ag@MSNs</b>	111	38.03	0.236
	200	44.38	0.203
	220	64.45	0.144
	311	77.42	0.123
	222	81.51	0.117
<b>MSNs-AgBrNPs</b>	200	30.93	0.288
	220	44.37	0.204
	222	55.09	0.166
	400	64.59	0.144
	420	73.28	0.128

Con el fin de conocer más en detalle las características de la red de sílice se estudian los diferentes parámetros texturales como la superficie específica, el tamaño y el volumen de los poros, de cada uno de los materiales. La porosimetría de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> facilita el seguimiento de las modificaciones de las partículas tras las distintas funcionalizaciones.

En el caso de la obtención de los materiales **MSNs-AgNPs**, se puede realizar el estudio completo de los distintos productos intermedios del proceso de síntesis. En primer lugar, se

parte de las MSNs, tras la eliminación del surfactante, para la funcionalización de la superficie, tanto interna como externa, con grupos amino. El material precursor, **MSNs-CTAB**, tal y como se ha comentado en casos anteriores, muestra una isoterma típica de un material no poroso, pero tras la extracción del surfactante, el material **MSNs** presenta la isoterma de tipo IV característica de los materiales mesoporosos de tipo MCM-41 (Figura III.32 A). Cuando, posteriormente, se modifica la superficie de las partículas, al introducir un alcoxisilano que presenta grupos amino, dando lugar al material **MSNs-NH-NH<sub>2</sub>**, se puede observar el cambio producido en la isoterma de adsorción-desorción, y el consecuente descenso de la superficie específica (Tabla III-7) corroborando la funcionalización. Además, el descenso en el diámetro y el volumen de poro (Tabla III-7, Figura III.32 B) confirma que este proceso ocurre, a su vez, en la superficie interna del material. Sin embargo, y como era de esperar tras la nucleación de las partículas de plata sobre la superficie de las **MSNs-NH-NH<sub>2</sub>**, el material **MSNs-AgNPs** muestra un aumento en el valor de  $S_{\text{BET}}$  (981,6 m<sup>2</sup>/g) con respecto al material predecesor (646,1 m<sup>2</sup>/g) debido a que, durante el proceso de reducción de los iones Ag<sup>+</sup> mediante vía térmica, se produce, también, la calcinación de la materia orgánica, recuperando el volumen libre que existía en la red de sílice antes de la funcionalización. El diámetro y el volumen de poro, también se recuperan, en parte, debido a este hecho, pero, al igual que ocurre con la superficie específica, no se observan valores iguales a los del material inicial ya que las AgNPs presentes bloquean en parte la adsorción de N<sub>2</sub> a nivel de superficie externa e interna.

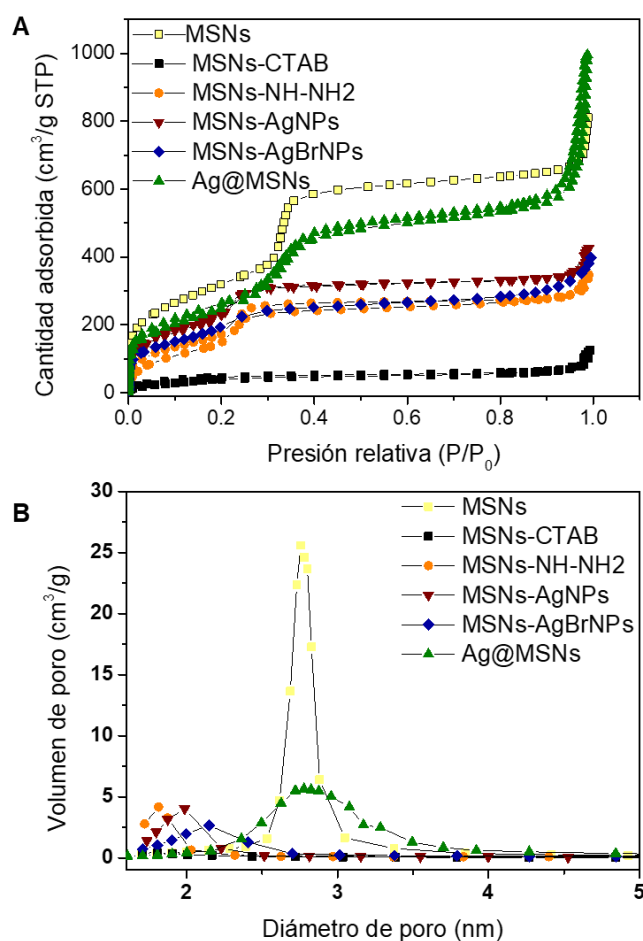


Figura III.32. Isotermas de adsorción  $\text{N}_2$  de los materiales MSNs con nanopartículas inorgánicas, así como los distintos materiales intermedios del proceso de síntesis (A). Distribuciones de tamaño de poro para todos los materiales (B).

El material **MSNs-AgBrNPs** muestra una isoterma (Figura III.32 A) similar a la que presentan el material con AgNPs, comentado anteriormente, y aunque el valor de la  $S_{\text{BET}}$  (723,0  $\text{m}^2/\text{g}$ ) es inferior en este material, el diámetro de poro (2.15 nm, Figura III.32 B) se asemeja al del material mesoporoso sin funcionalizar. La forma de la isoterma y el diámetro de poro confirman que se trata de un material mesoporoso y que al igual que en el caso del material con AgNPs, los valores inferiores de volumen de poro (Tabla III-7) se deben a la presencia de las pequeñas nanopartículas inorgánicas que bloquean en parte la entradas de los poros.



Tabla III-7. Parámetros texturales de los materiales MSNs obtenidos mediante las medidas de porosimetría de adsorción-desorción de  $N_2$ .

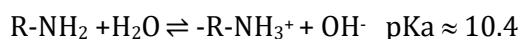
Material	$S_{BET}$ ( $m^2/g$ )	$D_p$ (nm)	$V_T$ ( $cm^3/g$ )	$V_p$ ( $cm^3/g$ )
<b>MSNs</b>	1178.8	2.76	1.22	0.95
<b>MSNs-CTAB</b>	167.8	-	-	-
<b>MSNs-NH-NH<sub>2</sub></b>	646.1	1.81	0.46	0.28
<b>MSNs-AgNPs</b>	981.6	1.99	0.56	0.50
<b>MSNs-AgBrNPs</b>	723.0	2.15	0.54	0.41
<b>Ag@MSNs</b>	920.1	2.80	1.54	0.77

$S_{BET}$ : área superficial específica obtenida mediante la ecuación BET.  $D_p$ : diámetro de poro calculado mediante el método BJH.  $V_T$ : volumen total de poro obtenido a  $P/P_0 = 0,97$ .  $V_p$ : volumen total de poro obtenido a  $P/P_0 = 0,60$ .

La forma de la isoterma de adsorción-desorción de tipo IV correspondiente al material **Ag@MSNs** confirma la red mesoporosa de sílice (Figura III.32 A). Este material presenta una elevada superficie específica ( $920.1 m^2/g$ ) similar a la obtenida en el material **MSNs-AgNPs**. Los valores del diámetro (2.80 nm) y volumen de poro ( $1.54 cm^3/g$ ) son comparables con el material **MSNs** sin funcionalizar (Figura III.32 B, Tabla III-7), corroborando que, en este caso, las AgNPs al formar parte del núcleo central de la partícula no supone un bloque de la red porosa de la sílice.

Las medidas de potencial Zeta ( $\zeta$ ) permiten evaluar los cambios que se originan en la densidad de carga superficial de los nanosistemas en el proceso de funcionalización y nucleación de nanopartículas inorgánicas (Tabla III-8). Como se puede observar, la funcionalización con el alcoxisilano que contiene grupos amino, para dar lugar al material **MSNs-NH-NH<sub>2</sub>**, provoca un cambio del potencial  $\zeta$  a valores positivos en comparación con las MSNs sin funcionalizar, debido a la existencia de grupos amino cargados positivamente en agua. Sin embargo, cuando se incorporan las AgNPs, ese potencial vuelve a los valores negativos observados para el material de partida ya que, tal y como se ha comentado anteriormente, en el material final, **MSNs-AgNPs**, se ha eliminado toda la materia orgánica. El potencial  $\zeta$  del material **MSNs-AgBrNPs** es similar al anterior confirmando que la presencia de AgBrNPs en lugar de AgNPs no supone una variación en dicho parámetro. En el caso del material núcleo@corteza **Ag@MSNs** el potencial  $\zeta$  también presenta un valor negativo similar a los materiales finales anteriores, confirmando en todos los casos la presencia de grupos silanoles cargados negativamente ( $-Si-O^-$ ) cuando las nanopartículas se encuentran en suspensión acuosa. Todos los cambios observados en el potencial  $\zeta$  pueden explicarse por los

posibles equilibrios ácido-base de los diferentes grupos funcionales que se encuentran sobre la superficie de las MSNs en agua y sus correspondientes valores de pKa. Así se puede encontrar la desprotonación de los grupos silanol y la protonación de los grupos amino primarios y secundarios en el caso del material MSNs-NH-NH<sub>2</sub> según las ecuaciones siguientes:<sup>208</sup>



En general, todos las MSNs exhiben valores de potencial  $\zeta$  lo suficientemente altos como para estar dentro de la zona de estabilidad coloidal.<sup>209</sup>

*Tabla III-8. Valores de potencial  $\zeta$  y tamaño hidrodinámico de partícula en agua de las MSNs con nanopartículas inorgánicas.*

Material	$\zeta$ -potential (mV)	Hydrodynamic size <sup>a</sup> (nm)
<b>MSNs</b>	-17 ± 6	144 ± 21
<b>MSNs-NH-NH<sub>2</sub></b>	10 ± 5	137 ± 8
<b>MSNs-AgNPs</b>	-18 ± 6	137 ± 20
<b>MSNs-AgBrNPs</b>	-19 ± 3	120 ± 21
<b>Ag@MSNs</b>	-19 ± 6	83 ± 13

<sup>a</sup> Los datos corresponden con el máximo de la distribución de tamaños medida por DLS.

Las medidas de dispersión de luz dinámica (DLS) muestran que la funcionalización de la superficie de las MSNs no supone una variación significativa en el máximo de distribución de tamaño hidrodinámico, así como la incorporación de las AgNPs (Tabla III-8). Además, en la distribución de tamaños del material **MSNs-AgNPs**, no se observan dos poblaciones por lo que se puede confirmar que las nanopartículas incorporadas se encuentran soportadas en la superficie de las MSNs. En el caso del material **MSNs-AgBrNPs**, el máximo de la distribución es similar al obtenido en el material homólogo, pero con AgNPs, y a su vez la presencia de una sola población demuestra la formación del material que soporta las AgBrNPs. El máximo de la distribución de tamaños en el caso del material **Ag@MSNs** es inferior que en todos los casos anteriores originado por el método diferente de obtención de las nanopartículas de sílice que determina en gran medida el tamaño final de las partículas.

### III.2.c. Nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con proteínas

Con el fin de proporcionar puntos de anclaje para las proteínas, las MSNs se funcionalizan en un primer paso con grupos ácidos utilizando el método de post-síntesis. En este caso, la reacción se realiza en ausencia de agua para evitar la autocondensación de los alcoxisilanos y favorecer una distribución homogénea de las moléculas orgánicas sobre los grupos silanoles de superficie. Además, se asume que la concentración media de Si-OH en la superficie de las nanopartículas en materiales de sílice es de  $4.9 \text{ -OH/nm}^2$ .<sup>210</sup>

Para conseguir un anclaje preferencial en la superficie externa de los materiales se emplean los materiales que todavía contienen la plantilla orgánica, es decir, el surfactante, en el interior de sus poros.<sup>211</sup> Y la cantidad de alcoxisilano requerida para la síntesis se determina para asegurar una funcionalización completa de la superficie externa. Para ello, se utiliza coimo aproximación que ésta se corresponde con un 25% de la superficie total del material y que la estequiometría de la reacción es de una relación molar 3:1 de Si-OH: R-Si-(OEt)<sub>3</sub>.

Posteriormente se realiza la extracción del surfactante empleando una disolución extractora que contiene etanol acidificado con el fin de conseguir a la vez la apertura del anillo del anhídrido. El proceso completo de síntesis se resume en la Figura III.33.

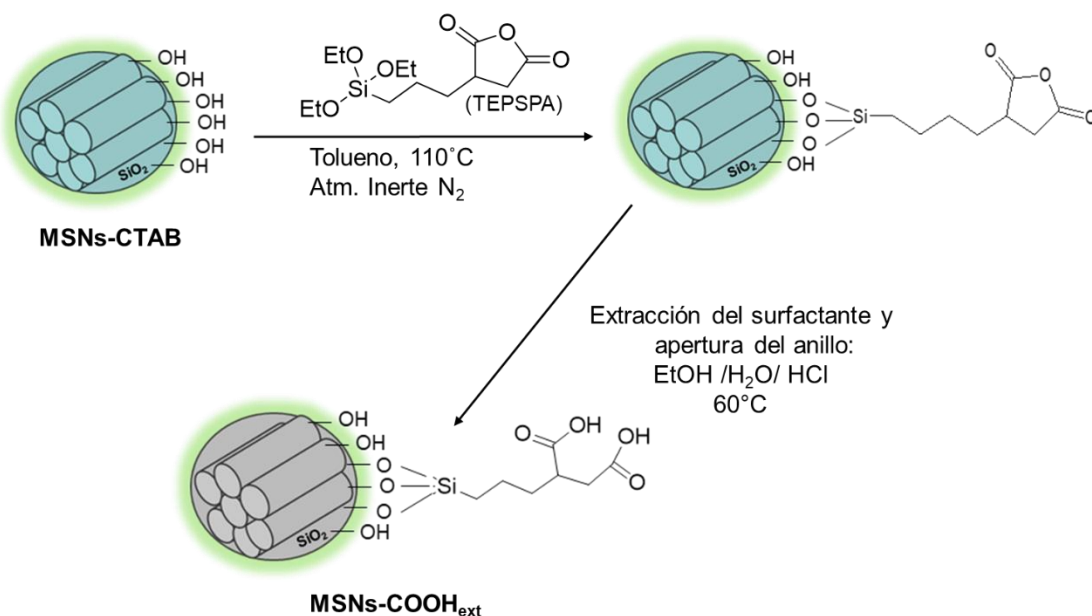


Figura III.33. Esquema de funcionalización de las MSNs con grupos ácidos en la superficie externa.

Una vez realizada la modificación de la superficie de los materiales con grupos -COOH se procede a realizar el anclaje de las proteínas mediante la formación de un enlace covalente amida, entre los grupos ácidos de la superficie de las MSNs y los grupos amina primaria libres de las proteínas, presentes en los aminoácidos lisina y arginina. Esta reacción de condensación

ha de realizarse en agua para mantener la integridad funcional de las proteínas y por tanto es importante seleccionar adecuadamente el pH al cual se lleva a cabo, con el objetivo de evitar las repulsiones electrostáticas entre las proteínas y las MSNs. Teniendo en cuenta los puntos isoeléctricos de las proteínas, el pH se fija por debajo del mismo para conseguir una carga positiva neta en las proteínas que no dé lugar a repulsiones con la superficie negativa de las partículas modificadas con grupos ácidos (pKa alrededor de 4.8 para ácidos carboxílicos en cadenas de 3 a 6 carbonos).<sup>212</sup>

Para asegurar el establecimiento del pH en el valor adecuado se requiere el uso de un tampón regulador de pH. Además, los grupos ácidos deben ser previamente activados utilizando química de carbodiimidas, para lo que se usa una disolución de Hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-atilcarbodiimida en agua bajo agitación vigorosa durante 3 h.

Teniendo en cuenta lo comentado anteriormente en todos los materiales preparados con proteínas se empleó el tampón MES (50 mM) al pH requerido en cada uno de los casos.

En la presente Tesis se muestran distintos tipos de materiales con diferentes proteínas, las cuales se pueden agrupar en función de la aplicación final del material. Así, se presentan materiales con proteínas para terapia dirigida y materiales con proteínas inmunomoduladoras para la aplicación en vacunas. En el primer caso, se emplea transferrina (Tf) y albúmina de suero bovino (BSA). En el segundo caso se lleva a cabo el anclaje de Ag85B, LprG y LprA, como proteínas capaces de activar el sistema inmune. Algunos de los parámetros característicos de todas las proteínas empleadas se muestran en la Tabla III-9, los cuales se han obtenido a partir de la secuencia de la proteína (NCBI GenBank o Uniprot) y el programa Expasy.<sup>213</sup>

*Tabla III-9. Parámetros de las proteínas empleadas en las síntesis de materiales modificados.*

<b>Proteínas (secuencia)</b>	<b>Punto isoelectrico teórico</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Nº de residuos positivos (Arg+Lys)</b>	<b>Nº de residuos negativos (Asp+Glu)</b>
BSA (CAA76847.1)	5.82	69.2	86	99
Tf (AAB22049.1)	6.97	76.9	85	87
Ag85B (A5U3Q3.1)	5.62	34.5	25	20
LprG (ANZ82088.1)	7.78	24.5	20	19
LprA (ANZ81937.1)	5.00	26.4	18	23

De tal forma que, en cada uno de los casos, el pH de la reacción se selecciona para conseguir que las proteínas se encuentren con una carga neta positiva y evitar así la repulsión electrostática con los grupos ácidos, cargados negativamente, de la superficie de las nanopartículas. En la Figura III.34 se muestra el efecto del pH en la carga neta de la proteína y en la Tabla III-10 se muestran los valores seleccionados en cada uno de los casos.

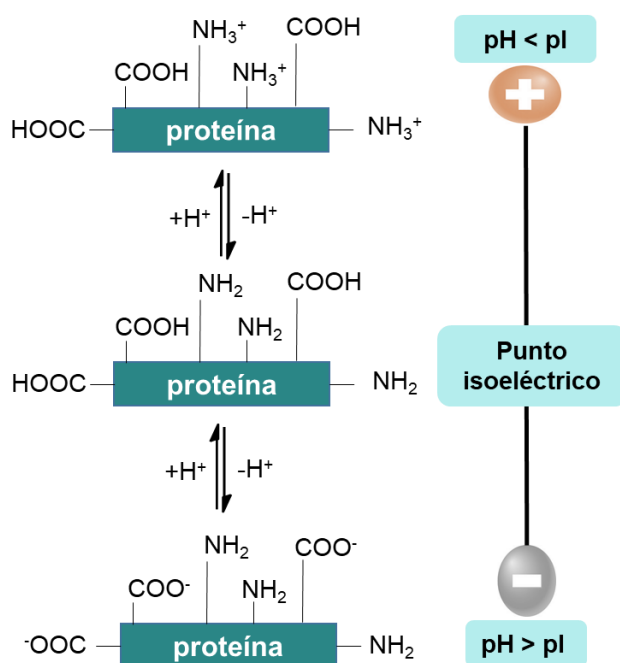


Figura III.34. Efecto del pH en la carga neta de la proteína.

Tabla III-10. Valores de pH seleccionados para las funcionalizaciones con proteínas.

Proteínas	Ag85B	LprG	LprA	BSA	Tf
pH seleccionado	4.8	6.7	4.0	4.8	6.0

Teniendo en cuenta todos estos datos, una vez que se ha realizado la activación de los grupos ácido de la superficie de las partículas **MSNs-COOH<sub>ext</sub>**, se procede al anclaje covalente de las proteínas para llegar a los materiales finales. El esquema general de la síntesis se muestra en la Figura III.35.

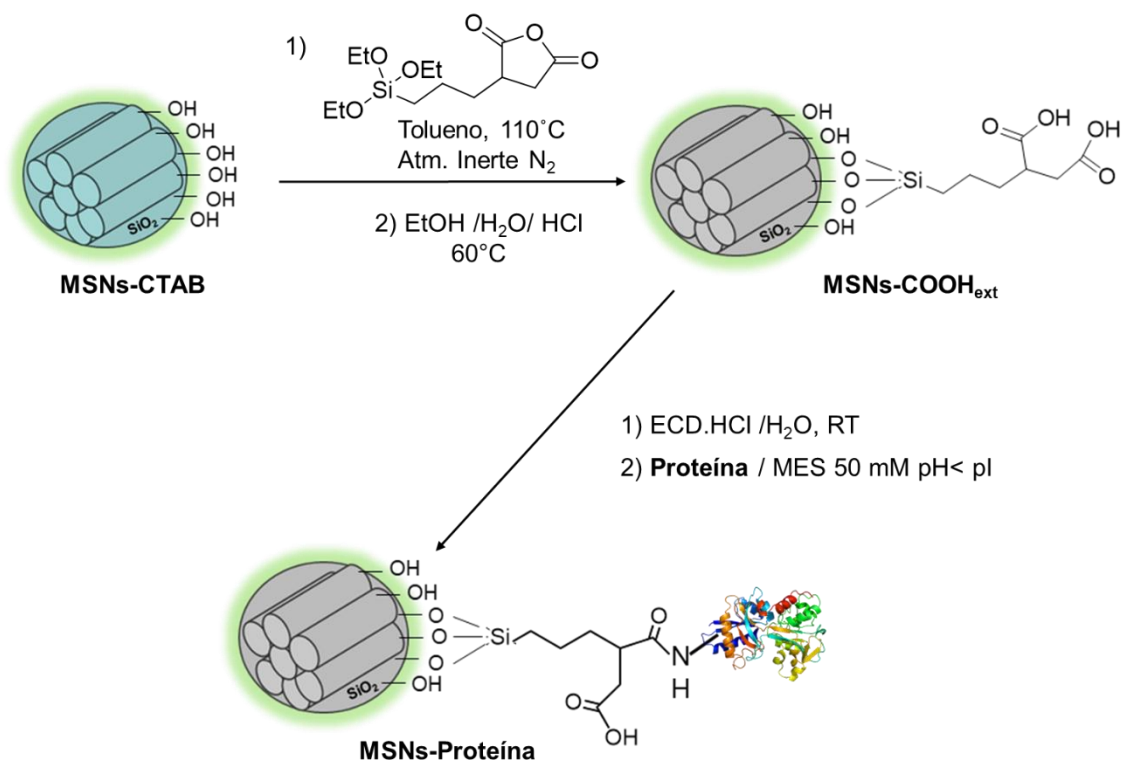


Figura III.35. Esquema de síntesis general para la obtención de materiales MSNs funcionalizados con proteínas.

#### III.2.c.1. MSNs con proteínas para vectorización: BSA y Tf

En primer lugar, se optimiza la cantidad de proteína empleada en la reacción de funcionalización. Para ello se tiene en cuenta la cantidad de grupos ácidos anclados, calculado a partir del porcentaje de materia orgánica del material final **MSNs- $\text{COOH}_{\text{ext}}$**  (13.64%), el cual se obtiene a través del análisis termogravimétrico. Es importante destacar que ese valor corresponde con los grupos alcóxidosilanos que no han condensado tras la reacción sol-gel de formación de las MSNs, junto con la materia orgánica que se ha introducido en la reacción. Si se sustrae el porcentaje que presenta el material sin funcionalizar y sin surfactante en los poros, en torno al 4% en función de las distintas síntesis, se puede conocer el porcentaje que suponen los grupos introducidos (9.11%). En base a ese porcentaje y al peso molecular del residuo que queda anclado en la superficie de las MSNs tras la funcionalización (Figura III.36) se calculan los moles de grupos ácido presentes en la muestra.

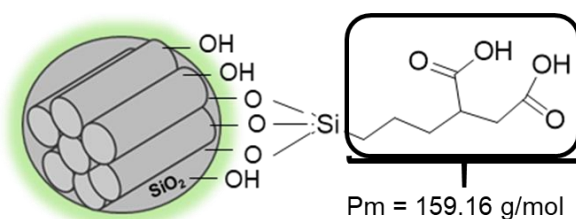


Figura III.36. Residuo orgánico anclado tras la funcionalización con el reactivo TEPSA.

De tal forma que, el material empleado en el anclaje de las proteínas presenta  $1.14 \times 10^{-3}$  moles de  $-\text{COOH}/\text{g}$  **MSNs- $\text{COOH}_{\text{ext}}$** , teniendo en cuenta que por cada molécula de residuo orgánico que se ancla tenemos 2 grupos ácidos. Por ello, y debido al impedimento estérico que supone el anclaje de biomoléculas de gran tamaño sobre la superficie de partículas del rango de los nanómetros, se establece una primera reacción de anclaje con  $3.03 \times 10^{-6}$  moles de proteína y 200 mg de **MSNs- $\text{COOH}_{\text{ext}}$**  ( $2.28 \times 10^{-4}$  moles de  $-\text{COOH}$ ). Los materiales obtenidos en esta síntesis son caracterizados por análisis termogravimétrico (TGA) con el fin de conocer la cantidad de proteína anclada en los mismos. Esos porcentajes corresponden con 11.4% y 9.25% para el material con BSA y Tf, respectivamente, en donde ya se han eliminado las contribuciones de la materia orgánica que no corresponde con proteína. A partir de esos datos de TGA, se calculan los moles de proteína anclados por gramo de material final, obteniéndose  $1.72 \times 10^{-6}$  moles de BSA/g **MSNs-BSA** y  $1.47 \times 10^{-6}$  moles de Tf/g **MSNs-Tf**.

Posteriormente, se realiza una segunda reacción de anclaje en donde se emplea un 10 % de exceso con respecto a la cantidad de proteína previamente calculada, la cual se refiere como la cantidad máxima que puede anclarse. Tras la funcionalización de los materiales finales y la caracterización de los mismos mediante TGA se puede comprobar que los porcentajes de materia orgánica que corresponden con proteína en cada uno de los casos son 9.75% y 9.30%, para la BSA y la Tf respectivamente. De tal forma que de nuevo se pueden calcular los moles de proteína anclados,  $1.47 \times 10^{-6}$  moles de BSA/g **MSNs-BSA** y  $1.20 \times 10^{-6}$  moles de Tf/g **MSNs-Tf**, obteniéndose valores similares a los de la síntesis con un exceso grande de proteína.

En base a todos los resultados obtenidos en este proceso de optimización se determina que, empleando un exceso del 10 % sobre la cantidad real que se puede anclar sobre el material, se obtienen resultados satisfactorios de anclaje minimizando el gasto de proteína. Por ello, estas condiciones, en donde la relación molar  $n_{\text{COOH}}:n_{\text{Proteína}}$  es de  $1 : 1.4 \times 10^{-3}$ , se emplearon en las sucesivas reacciones de anclaje de las distintas proteínas que se muestran en la presente Tesis Doctoral.

A continuación, se muestran las caracterizaciones de los distintos materiales que están implicados en la secuencia de síntesis para llegar a los materiales finales **MSNs-BSA** y **MSNs-Tf**.

Algunas de las técnicas de caracterización que permiten el seguimiento de la incorporación de contenido orgánico sobre las MSNs son el análisis termogravimétrico (TGA) y el análisis químico elemental (AQE). En la

Tabla III-11 se muestran los valores de ambos análisis para los diferentes materiales. Los resultados obtenidos, confirman, como era de esperar, el aumento sucesivo del contenido orgánico después de la funcionalización de las MSNs con el alcoxisilano que contiene grupos ácidos, en el primer paso, y con las proteínas ancladas en el segundo paso. Además, el incremento en el contenido de azufre y nitrógeno en las muestras **MSNs-BSA** y **MSNs-Tf** confirman la presencia de los aminoácidos que conforman las proteínas ancladas.

*Tabla III-11. Contenido orgánico y composición elemental obtenido a partir de los análisis termogravimétricos y químicos de las MSNs y las MSNs funcionalizados.*

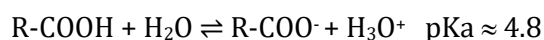
Material	Cont. Org. Teórico (wt%)	Contenido Org. (wt%)	%C	%N	%S
<b>MSNs</b>	-	4.53	3.64	0.05	0.03
<b>MSNs-COOH<sub>ext</sub>-CTAB</b>	-	36.27 <sup>b</sup>	30.86	1.85	0.02
<b>MSNs-COOH<sub>ext</sub></b>	9.73	7.81 <sup>b</sup>	10.11	0.10	0.01
<b>MSNs-BSA</b>	19.54 <sup>a</sup>	17.56 <sup>b</sup>	14.27	2.93	0.26
<b>MSNs-Tf</b>	19.55 <sup>a</sup>	17.11 <sup>b</sup>	13.94	2.86	0.26

<sup>a</sup> El contenido orgánico teórico (wt%) se calcula sin tener en cuenta las pérdidas de moléculas de agua que se producen en la reacción de condensación de anclaje de las proteínas. <sup>b</sup> El contenido orgánico (wt%) se determina mediante las pérdidas de masa por TGA, excluyendo las pérdidas debidas a la desorción de agua (> 125°C) y con las correcciones por las pérdidas de masa que corresponden con los alcoxisilanos que quedan sin condensar tras la reacción sol-gel (valor obtenido para el material MSNs sin funcionalizar y sin surfactante).

Las medidas de potencial Zeta ( $\zeta$ ) y los tamaños hidrodinámicos permiten evaluar los diversos cambios que se originan en el proceso de funcionalización (Tabla III-12). En base a los resultados obtenidos se puede observar como la funcionalización con el alcoxisilano TESPSA da lugar a un potencial más negativo en comparación con las MSNs sin funcionalizar, debido a la coexistencia de grupos cargados negativamente de sílice en agua ( $-\text{SiO}^-$ ) y grupos  $-\text{COO}^-$  que provienen de los nuevos grupos funcionales incorporados. Este hecho puede explicarse en función de los posibles equilibrios ácido-base de los grupos funcionales que se encuentran en las



MSNs en agua y sus correspondientes valores de pKa. Así se puede encontrar la desprotonación de los grupos silanol y la desprotonación de los grupos ácido, según las ecuaciones siguientes:<sup>208</sup>



La posterior introducción de las proteínas en **MSNs-COOH<sub>ext</sub>** provoca un cambio hacia un potencial  $\zeta$  menos negativo. Estos resultados son consistentes con el hecho de que sólo una pequeña proporción de los grupos -COOH son convertidos en enlaces amida debido al impedimento estérico de las proteínas. Además, en el medio acuoso, en el cual se realizan las medidas, las proteínas deben estar por encima o próximas a su punto isoeléctrico, es decir, cargadas negativamente o prácticamente con carga neutra, por lo que no influyen en el valor final. En general, todos las MSNs exhiben valores de potencial  $\zeta$  negativos lo suficientemente altos como para estar dentro de la zona de estabilidad coloidal.<sup>209</sup>

Las medidas de dispersión de luz dinámica (DLS) muestran distribuciones tamaño hidrodinámico entre 130 - 250 nm para todos los materiales MSNs. El máximo de la distribución del tamaño no se ve alterado significativamente durante los procesos de funcionalización con el alcoxisilano y las proteínas. Sin embargo, tal y como se muestra en la Tabla III-12, los materiales **MSNs-BSA** y **MSNs-Tf** poseen un tamaño hidrodinámico inferior al de las MSNs sin funcionalizar y las **MSNs-COOH<sub>ext</sub>**, debido a una disminución en la agregación de las nanopartículas en medio acuoso. Por lo tanto, la presencia de macromoléculas orgánicas unidas a la superficie externa de las MSNs contribuye a la formación de una repulsión estérica que disminuye el tamaño de los agregados en disolución.

Tabla III-12. Valores de potencial  $\zeta$  y tamaño hidrodinámico de partícula en agua de las MSNs

Material	Potencial $\zeta$ (mV)	Tamaño hidrodinámico <sup>a</sup> (nm)
<b>MSNs</b>	-25 ± 8	199 ± 8
<b>MSNs-COOH<sub>ext</sub></b>	-29 ± 5	209 ± 15
<b>MSNs-BSA</b>	-21 ± 3	166 ± 33
<b>MSNs-Tf</b>	-20 ± 4	166 ± 16

<sup>a</sup> Los datos corresponden con el máximo de la distribución de tamaños medida por DLS.

Los resultados obtenidos mediante porosimetría de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> nos aportan información sobre las propiedades texturales de los materiales y sobre las modificaciones

que sufre la superficie específica ( $S_{BET}$ ) de los materiales, así como el tamaño de los poros y la integridad de los mismos. Como se observa en la Figura III.37, y tal y como era de esperar, las **MSNs-CTAB** muestran la isoterma característica de un material no poroso. Tras la funcionalización con grupos ácidos y la extracción del surfactante, los materiales **MSNs-COOH<sub>ext</sub>** muestran un valor mayor de superficie específica (649.79 m<sup>2</sup>/g) y gran volumen de poro (0.409 cm<sup>3</sup>/g). Estos valores son inferiores a los del material extraído inicial, sin funcionalizar, lo que confirma el anclaje de los ácidos carboxílicos. Este material extraído exhibe la isoterma característica de tipo IV, como se comentó para los materiales **MSNs** (apartado III.2.a), verificando la presencia de la estructura mesoporosa con canales cilíndricos. Después de la unión covalente de las proteínas sobre la superficie externa de las nanopartículas, la  $S_{BET}$  y el volumen de los poros, se reducen considerablemente debido al bloqueo parcial de la entrada de los poros por parte de las macromoléculas.

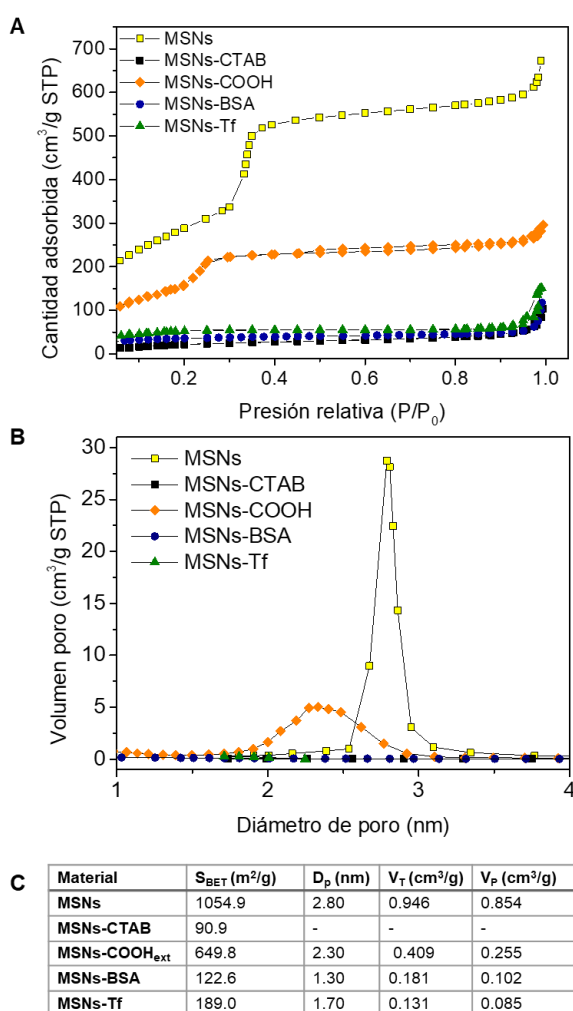


Figura III.37. Isotermas de adsorción N<sub>2</sub> de los materiales MSNs, antes y después de la funcionalización con grupos ácidos carboxílicos y proteínas (A). Distribuciones de tamaño de poro para las muestras mesoporosas (B). Parámetros texturales de las MSNs obtenidos por las medidas de adsorción N<sub>2</sub> (C), donde  $S_{BET}$  es la superficie específica obtenida por medio de la ecuación BET,  $D_p$  es el diámetro de los poros calculado por el método BJH,  $V_T$  es el volumen total de poros obtenido en  $P/P_0=0,99$  y  $V_P$  es el volumen total de poros obtenido en  $P/P_0 = 0,60$ .

El registro de los espectros de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  CP MAS NMR de los materiales permite conocer información sobre la incorporación de la materia orgánica y confirmar el anclaje covalente de las proteínas. La Figura III.38 muestra los espectros obtenidos de los diferentes materiales, a modo de ejemplo de un material con proteína se muestra el espectro de **MSNs-BSA**. Los dos picos a 64 y 15 ppm, que son comunes en todos los espectros, corresponden a los grupos metileno y metilo, respectivamente, de los residuos etoxi debido a un proceso de hidrólisis y condensación incompleto del precursor de tetraetilortosilicato durante la síntesis sol-gel de las MSNs.<sup>214</sup> Estos grupos de etoxi representan alrededor de un 5% del contenido orgánico en el análisis TG de las MSNs extraídos, lo que no se corresponde con el tensioactivo restante, ya que el %N es insignificante (véase la Tabla III-11).

El espectro de **MSNs-COOH<sub>ext</sub>** (Figura III.38 B), muestra las señales del ácido propilsuccínico hidrolizado presentes en el material híbrido. La señal amplia en 178 ppm corresponde con el carbonilo de los grupos de ácido carboxílico. Así, la designación del resto de señales es la siguiente: la señal a 43 ppm (señal d) corresponde con el -CH adyacente al carbonilo y el pico a 37 ppm coincide con la suma de los grupos -CH<sub>2</sub> cercanos al grupo del ácido carboxílico (señal c y e). El pico a 21 ppm concuerda con el carbono del grupo metileno de la cadena (señal b) y, finalmente, el carbono del metileno, directamente unido al átomo de silicio, corresponde con el pico a 13 ppm (señal a). En la Figura III.38 C, se puede observar el espectro de **MSNs-BSA**, en donde los desplazamientos químicos mostrados coinciden con los del espectro NMR de una disolución de la respectiva proteína BSA libre (Figura III.39). Además, la señal del carbonilo a 178 ppm se ensancha con respecto al material **MSNs-COOH<sub>ext</sub>** debido a la presencia de grupos carbonilo de ácidos carboxílicos y enlaces amida en la propia estructura proteica. Sin embargo, aparece una señal más intensa a 158 ppm, la cual no se observaba en el material previo, y que corrobora la formación de amidas entre los grupos -COOH de la superficie de las MSNs modificados y los grupos -NH<sub>2</sub> de algunos aminoácidos de lisina y arginina de la proteína.

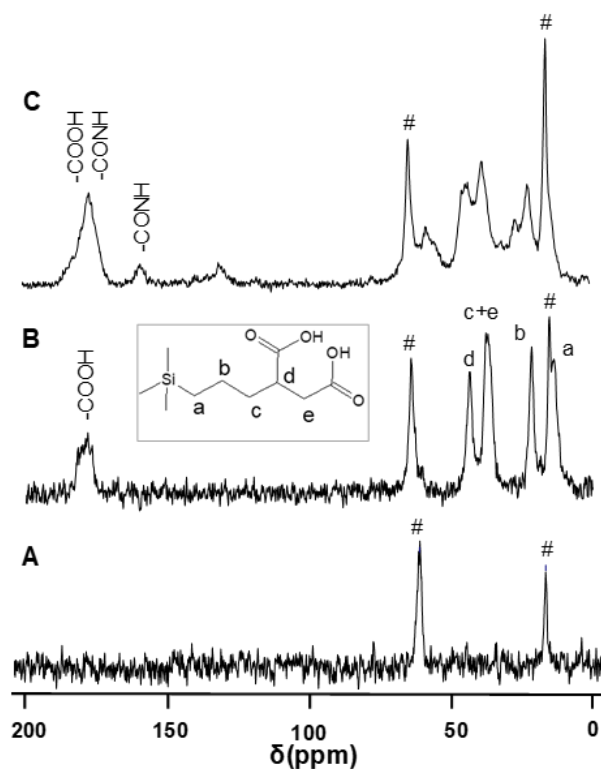


Figura III.38. Espectros de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  CP MAS NMR de materiales: **MSNs** (A), **MSNs- $\text{COOH}_{\text{ext}}$**  (B) y **MSNs-BSA** (C). Los picos designados con # corresponden a grupos etoxi debido a una hidrólisis y condensación incompleta.

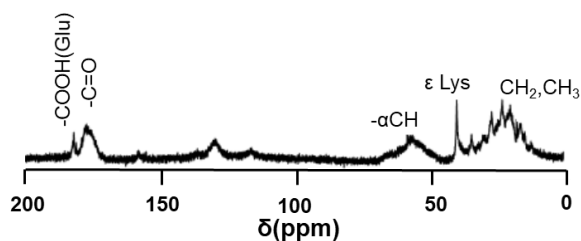


Figura III.39. Espectro de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR de BSA, en  $\text{D}_2\text{O}$  (330 mg/mL). Asignación de las señales basadas en referencia.<sup>215</sup>

La espectroscopia de  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR en estado sólido aporta información detallada sobre la red de sílice y las modificaciones que sufre tras la funcionalización mediante reacciones de condensación post-síntesis. Los resultados obtenidos permiten la comparación de los materiales de partida **MSNs** con los funcionalizados, **MSNs- $\text{COOH}_{\text{ext}}$**  y **MSNs-BSA** (Figura III.40, izquierda).

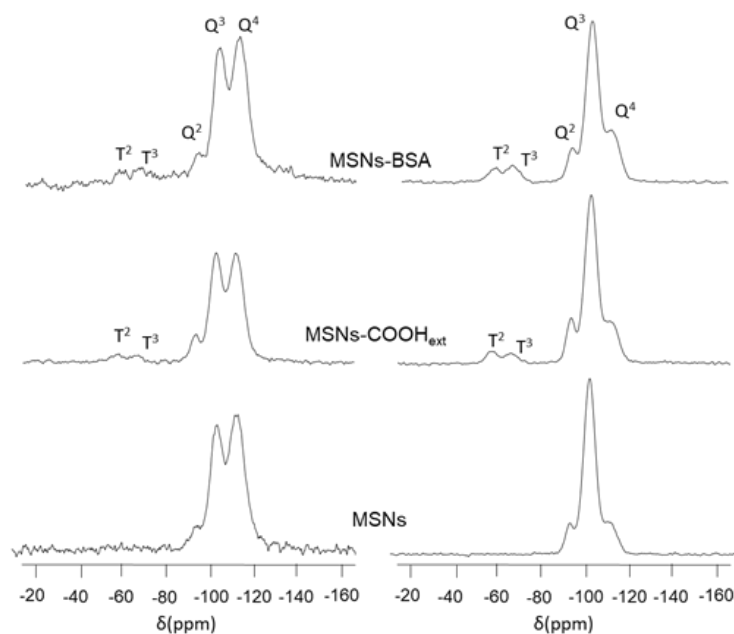


Figura III.40. Espectros de  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR (izquierda) y  $^{29}\text{Si}$  CP MAS NMR (derecha) de **MSNs**, **MSNs- $\text{COOH}_{\text{ext}}$**  y **MSNs-BSA**.

A su vez, también se registraron espectros de  $^{29}\text{Si}$  CP MAS NMR (Figura III.40, derecha) para evaluar la existencia de unidades  $\text{T}^n$  que corresponden con unidades  $[\text{R-Si}(\text{OSi})_n(\text{OX})_{3-n}]$  ( $\text{X} = \text{H}, \text{C}$ ), cuya representación esquemática de muestra en la Figura III.41. Este método utiliza la polarización cruzada de los protones cercanos y aunque da lugar a experimentos no cuantitativos pero permite confirmar la presencia de la funcionalización de los trialcoxisilanos en los materiales. Así, las unidades  $\text{T}^2$   $[\text{R-Si}(\text{OSi})_2(\text{OX})]$  y  $\text{T}^3$   $[\text{R-Si}(\text{OSi})_3]$  corresponden con las señales a -57 y -66 ppm, respectivamente, en los espectros CP de los materiales **MSNs- $\text{COOH}_{\text{ext}}$**  y **MSNs-BSA**.

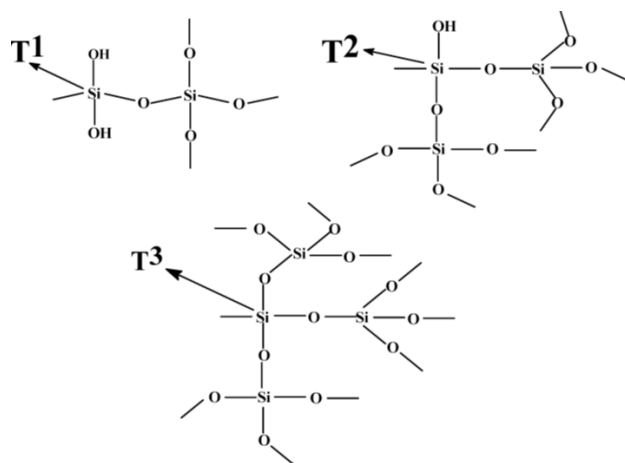


Figura III.41. Representación esquemática de los entornos  $\text{T}^n$  en la red de sílice.<sup>216</sup>

La Tabla III-13 muestra los desplazamientos químicos y las poblaciones (%) de los entornos diferentes que muestra el silicio obtenidos a partir de los espectros de  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR.

Tabla III-13. Valores de los desplazamientos químicos y las poblaciones (%) de los entornos  $Q^n$  y  $T^n$  del silicio, así como de las relaciones de área de pico,  $(Q^2 + Q^3)/Q^4$  y  $Q^n/T^n$ , en función de la deconvolución de los espectros de  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR de los materiales MSNs.

Material	$\delta$ , ppm (peak area, %)				$\delta$ (ppm)		peak area
	$Q^2$	$Q^3$	$Q^4$	$(Q^2 + Q^3)/Q^4$	$T^2$	$T^3$	
MSNs	-93.2 (6.2)	-102.3 (44.6)	-112.0 (49.1)	1.0	---	---	---
MSNs-COOH <sub>ext</sub>	-93.6 (3.2)	-102.7 (36.5)	-112.0 (60.2)	0.6	-57.8	-66.9	15.3
MSNs-BSA	-92.5 (3.7)	-102.8 (32.1)	-112.5 (64.0)	0.5	-58.3	-66.4	15.7

En todos los casos, los espectros muestran tres resonancias alrededor de -93, -102 y -113 ppm correspondiendo con los entornos de silicio  $Q^2$  [ $\text{Si}(\text{OSi})_2(\text{OX})_2$ ],  $Q^3$  [ $\text{Si}(\text{OSi})_3(\text{OX})$ ] y  $Q^4$  [ $\text{Si}(\text{OSi})_4$ ], respectivamente, y donde  $X = \text{H}, \text{C}$ . Estos entornos se muestran esquematizados en la Figura III.42.

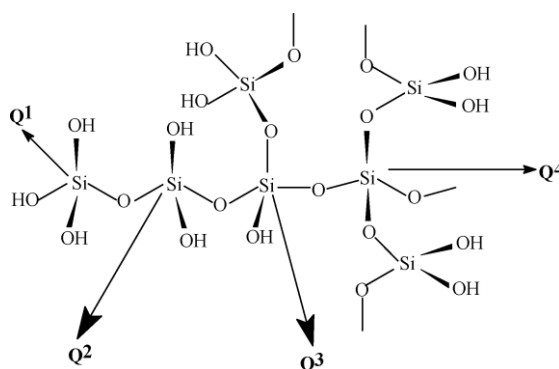


Figura III.42. Representación esquemática de los entornos  $Q^n$  en la red de sílice.<sup>216</sup>

La funcionalización con alcoxisilanos en la superficie de la sílice provoca una disminución de las áreas de pico de los entornos  $Q^2$  y  $Q^3$  y, un aumento de la población  $Q^4$  debido a la conversión de  $\text{Si-OH}$  a especies  $\text{Si-O-Si}$  totalmente condensadas. Como se muestra en la Tabla III-13, esa disminución de las áreas de pico en  $Q^2$  y  $Q^3$  y el aumento de  $Q^4$  confirman

el anclaje covalente de TESPSA en **MSNs-COOH<sub>ext</sub>**. La proporción relativa de los entornos de silicio parcialmente condensados frente a los condensados por completo,  $(Q^2 + Q^3)/Q^4$ , confirma que la superficie interna de los canales se preserva de la funcionalización, ya que este paso se realiza antes de la etapa de extracción del surfactante. Estos resultados corroboran el valor de diámetro de poro, obtenido mediante porosimetría de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>, que no muestra grandes cambios al compararlo con el obtenido para el material sin funcionalizar (véase Figura III.37 B y C). Como era de esperar, las poblaciones de los entornos Q<sup>n</sup> en **MSNs-BSA** se mantienen en comparación con el material anterior, **MSNs-COOH<sub>ext</sub>**, ya que la proteína se ancla a través de los grupos de ácido carboxílico. La relación de los entornos Q<sup>n</sup>/T<sup>n</sup> también se mantiene cuando se compara **MSNs-COOH<sub>ext</sub>** con **MSNs-BSA**, soportando este hecho y confirmando que la unión covalente de las proteínas no implica emplazamientos de silicio.

### III.2.c.2. MSNs con proteínas inmunomoduladoras: Ag85B, LprG y LprA.

La síntesis de nanomateriales con proteínas inmunomoduladoras se lleva a cabo de forma análoga a la comentada para los materiales con proteínas para vectorización. Las proteínas empleadas, en este caso, pertenecen a la especie *Mycobacterium tuberculosis* y son responsables tanto de la virulencia de la bacteria como de la activación del sistema inmune. Dichas proteínas son generalmente secretadas por Mtb en vesículas. Las proteínas empleadas Ag85B, LprG y LprA son amplificadas y clonadas en vectores pET23b para su posterior expresión en *Escherichia coli*.

Previamente al anclaje de estas proteínas sobre los materiales funcionalizados con grupos ácidos en la superficie externa, se realizó la caracterización por MALDI-TOF de las mismas. Esta caracterización permite confirmar que las proteínas, las cuales se obtienen mediante vectores de expresión, presentan un nivel de pureza adecuado para obtener nanotransportadores específicos de la proteína deseada. El espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF confirman la presencia de un pico a un valor m/z 32117.49, correspondiendo con el pico molecular del Ag85B, en el caso del antígeno 85B (Figura III.43A). En el caso de los espectros obtenidos para las dos lipoproteínas, LprG (Figura III.43B) y LprA (Figura III.43C), se observa el pico molecular a valores de m/z de 23168.44 y 24017.55, respectivamente. Pero como se puede observar también presentan picos a valores de m/z que corresponden al doble y triple con respecto al molecular.

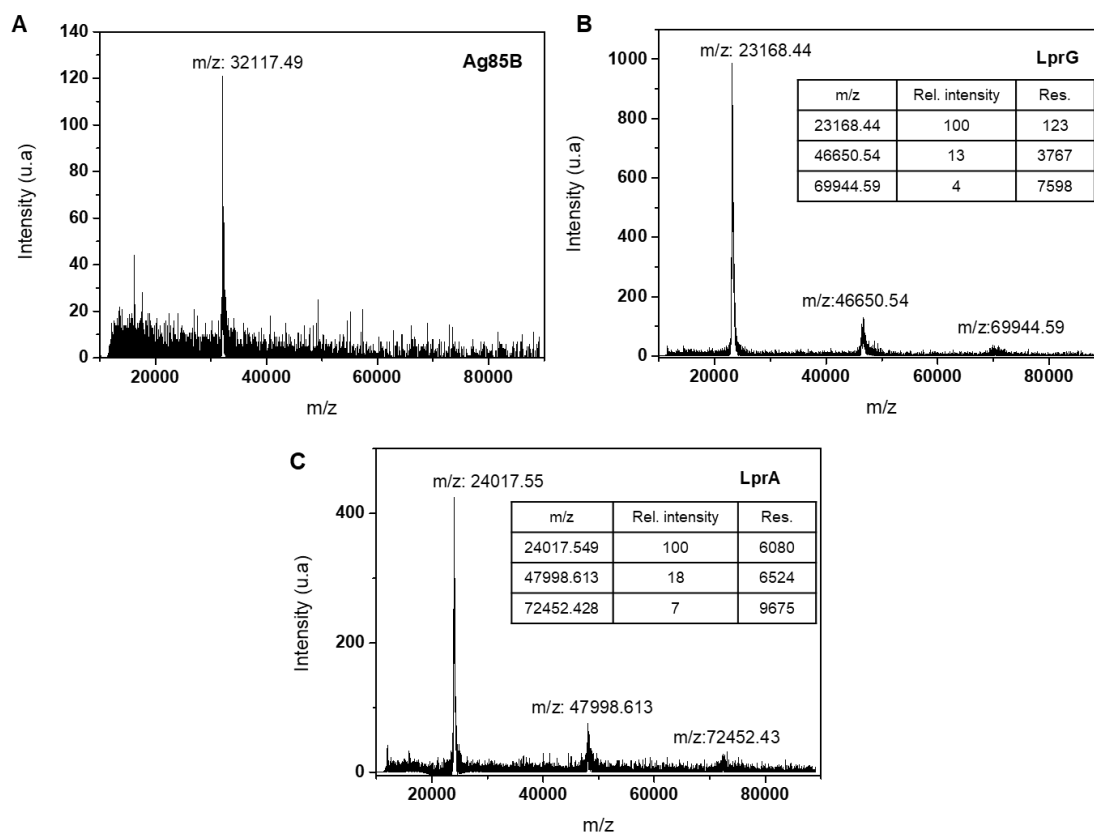


Figura III.43. Espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF de las proteínas inmunomoduladoras libres: Ag85B (A), LprG(B) y LprA (C).

Como se ha comentado anteriormente la síntesis de los materiales finales **MSNs-Ag85B**, **MSNs-LprG** y **MSNs-LprA** conlleva dos etapas de síntesis con la obtención del material intermedio **MSNs-COOH<sub>ext</sub>**. La cantidad de proteína empleada en este caso corresponde con la relación optimizada previamente con las proteínas modelo, BSA y Tf. El esquema completo de síntesis se muestra en la Figura III.44.



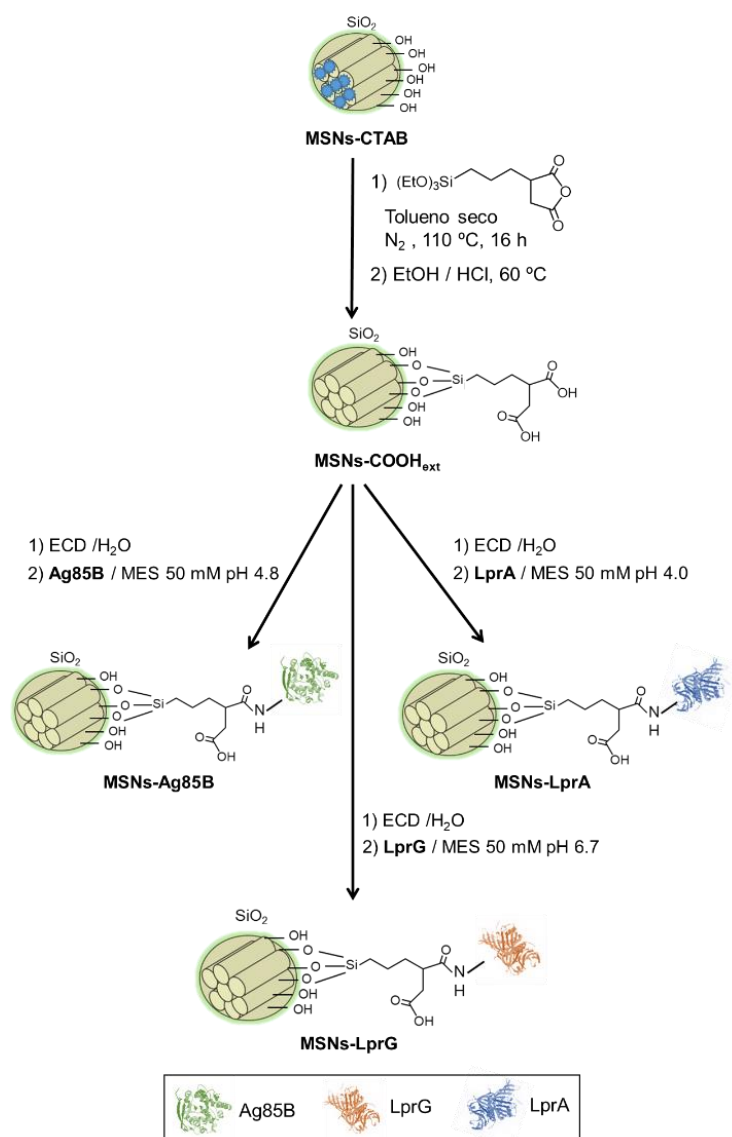


Figura III.44. Esquema de síntesis de las MSNs funcionalizados con proteínas inmunomoduladoras.

El seguimiento de la incorporación de los grupos ácidos y las proteínas se evalúa mediante análisis termogravimétrico (TGA). Los resultados obtenidos (Tabla III-14) muestran los incrementos, debido a la funcionalización con alcoxisilanos y posteriormente por el anclaje covalente de las proteínas. Además, tras la síntesis se ha realizado un ensayo Bradford<sup>217</sup> para cuantificar la cantidad de proteína que queda sin anclar en cada uno de los medios de reacción. Como se puede observar, en todos los casos, las reacciones de funcionalización con las proteínas presentan porcentajes de anclaje iguales o superiores al 95 %, confirmando que la cantidad optimizada de proteína para la reacción de anclaje es adecuada para una funcionalización completa.

Tabla III-14. Contenido orgánico obtenido a partir de los análisis termogravimétricos de las MSNs y las MSNs funcionalizados. Concentración de proteína sin anclar y el % de anclaje correspondiente a cada uno de los materiales finales.

Material	Cont. Org. Teórico (wt%)	Cont. Org. (wt%)	[Prot] nominal $\mu\text{g.mL}^{-1}$	[Prot. no anclada] <sup>c</sup> $\mu\text{g.mL}^{-1}$	% anclaje
MSNs	-	3.9	-	-	-
MSNs-CTAB- COOH <sub>ext</sub>	-	34.6 <sup>b</sup>	-	-	-
MSNs-COOH <sub>ext</sub>	8.34	5.7 <sup>b</sup>	-	-	-
MSNs-Ag85B	11.03 <sup>a</sup>	8.1 <sup>b</sup>	91.9	0.64	99%
MSNs-LprG	10.26 <sup>a</sup>	8.7 <sup>b</sup>	67.47	0.56	99%
MSNs-LprA	10.39 <sup>a</sup>	8.6 <sup>b</sup>	71.96	3.89	95%

<sup>a</sup> El contenido orgánico teórico (wt%) se calcula sin tener en cuenta las pérdidas de moléculas de agua que se producen en la reacción de condensación de anclaje de las proteínas. <sup>b</sup> El contenido orgánico (wt%) se determina mediante las pérdidas de masa por TGA, excluyendo las pérdidas debidas a la desorción de agua (> 125°C) y con las correcciones por las pérdidas de masa que corresponden con los alcóxidos que quedan sin condensar tras la reacción sol-gel (valor obtenido para el material MSNs sin funcionalizar y sin surfactante). <sup>c</sup> Determinada mediante ensayo Bardford en el sobrenadante de la reacción.

En base a estos rendimientos de anclaje se pueden conocer la cantidad de la proteína por gramo de material final (Tabla III-15).

Tabla III-15. Cantidades de proteína por gramo de material final.

Material	g proteína/g MSNs-proteína
MSNs-Ag85B	0.029
MSNs-LprG	0.021
MSNs-LprA	0.024

Las medidas de potencial Zeta ( $\zeta$ ) y los tamaños hidrodinámicos de los diferentes materiales (Tabla III-16) permiten conocer en más detalle la estabilidad coloidal de los mismos y los cambios producidos con las distintas funcionalizaciones. Los resultados obtenidos muestran la variación hacia potenciales zeta más negativos cuando se produce la funcionalización de la sílice con el alcoxisilano que contiene los grupos ácido, según los posibles equilibrios que se han comentado anteriormente en el apartado III.2.c.1. Sin embargo, y como ocurre cuando se anclan la BSA o la Tf sobre las **MSNs-COOH<sub>ext</sub>**, la incorporación de las proteínas inmunomoduladoras provoca un cambio hacia un potencial  $\zeta$  menos negativo. Por otro lado, las medidas de dispersión de luz dinámica (DLS) muestran en todos los casos distribuciones de tamaño hidrodinámico entre 150 - 260 nm. Las distintas funcionalizaciones no provocan alteraciones significativas de los máximos de las distribuciones de tamaño (Tabla III-16). Sin embargo, y a diferencia de los materiales con las proteínas modelo BSA y Tf, los materiales **MSNs-Ag85B**, **MSNs-LprG** y **MSNs-LprA** muestran tamaños hidrodinámicos cercanos a los de las MSNs sin funcionalizar y no inferiores a estos, debido, probablemente, al menor tamaño de estas proteínas, lo que supone menor impedimento estérico. Por lo tanto, en este caso la presencia de las biomoléculas unidas a la superficie externa de las MSNs contribuye a reducir la agregación con respecto al material **MSNs-COOH<sub>ext</sub>** pero sin grandes diferencias respecto al material de partida.

Tabla III-16. Valores de potencial  $\zeta$  y tamaño hidrodinámico de partícula en agua de las MSNs.

Material	Potencial $\zeta$ (mV)	Tamaño hidrodinámico (nm) <sup>a</sup>
<b>MSNs</b>	-19 ± 8	176 ± 13
<b>MSNs-COOH<sub>ext</sub></b>	-28 ± 7	223 ± 29
<b>MSNs-Ag85B</b>	-24 ± 6	178 ± 18
<b>MSNs-LprG</b>	-27 ± 7	192 ± 18
<b>MSNs-LprA</b>	-25 ± 8	182 ± 20

<sup>a</sup> Los datos corresponden con el máximo de la distribución de tamaños medida por DLS.

Los nanomateriales obtenidos en las distintas etapas de síntesis fueron caracterizados mediante porosimetría de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos nos muestran como el material de partida **MSNs-CTAB** presenta un isoterma de material no poroso, a diferencia del mismo sin surfactante, **MSNs**, que muestra la isoterma típica de tipo IV (Figura III.45) y posee

valores de superficie específica elevada ( $1054.9 \text{ m}^2/\text{g}$ ) y gran volumen de poro ( $0.946 \text{ cm}^3/\text{g}$ ). Las funcionalizaciones realizadas sobre el material de partida dan lugar a reducciones en la superficie específica del material **MSNs-COOH<sub>ext</sub>** ( $S_{\text{BET}} = 649.8 \text{ m}^2/\text{g}$ ) con respecto al material sin funcionalizar, **MSNs**, y el diámetro de poro prácticamente no se ve afectado, confirmando así la funcionalización preferencialmente en la superficie externa del nanomaterial. Cuando se introduce la proteína la superficie y el diámetro de poro se reducen ligeramente con respecto al material anterior debido al bloqueo parcial de los poros por la presencia de la proteína en la superficie del nanomaterial.

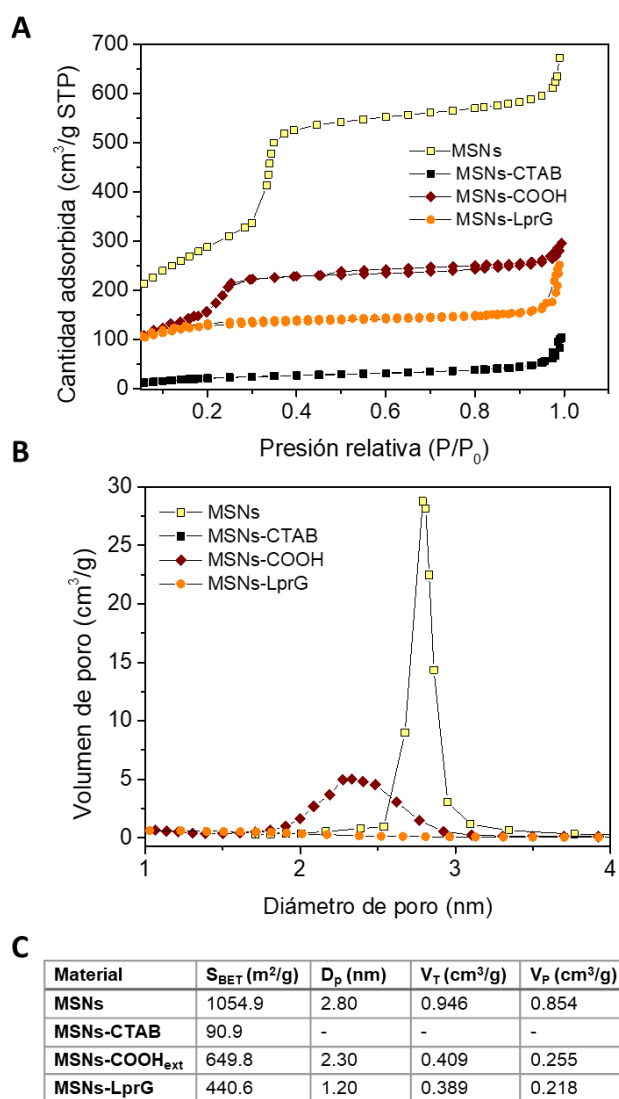


Figura III.45. Isotermas de adsorción  $\text{N}_2$  de los materiales MSNs, antes y después de la funcionalización con grupos ácidos carboxílicos y proteínas (A). Distribuciones de tamaño de poro para las muestras mesoporosas (B). Parámetros texturales de las MSNs obtenidos por las medidas de adsorción  $\text{N}_2$  (C), donde  $S_{\text{BET}}$  es la superficie específica obtenida por medio de la ecuación BET,  $D_p$  es el diámetro de los poros calculado por el método BJH,  $V_T$  es el volumen total de poros obtenido en  $P/P_0=0.99$  y  $V_P$  es el volumen total de poros obtenido en  $P/P_0 = 0.60$ .

La espectroscopia de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  CP MAS NMR de los materiales permite confirmar la presencia de las proteínas en los materiales finales y además nos corrobora la unión covalente de las mismas. En este caso, las caracterizaciones de este tipo se han realizado con los diferentes materiales de la secuencia de síntesis para el material final **MSNs-LprG**, a modo de ejemplo representativo para el resto de los materiales finales, **MSNs-Ag85B** y **MSNs-LprA**.

Al igual que se ha comentado anteriormente en materiales similares, se pueden observar dos picos (designados en el espectro con #) comunes en todos los espectros que corresponden con los grupos metileno y metilo de los residuos etoxi que han quedado sin hidrolizar y condensar por completo (Figura III.46). La asignación de las señales del espectro del material **MSNs-COOH<sub>ext</sub>** (Figura III.46 B) es idéntica a la comentada en el apartado III.2.c.1, correspondiendo al ácido propilsuccínico hidrolizado presente en el material híbrido. En el espectro del material **MSNs-LprG** (Figura III.46 C) se observa el ensanchamiento de la señal del carbonilo en torno a los 178 ppm debido a la presencia de los grupos de ácidos carboxílicos y enlaces amida de la estructura proteica y a su vez, aparece una señal nueva con respecto al material **MSNs-COOH<sub>ext</sub>**, aprox. 155 ppm que confirma la formación de enlaces tipo amida, los cuales corresponden a la unión covalente entre la proteína y el nanomaterial.

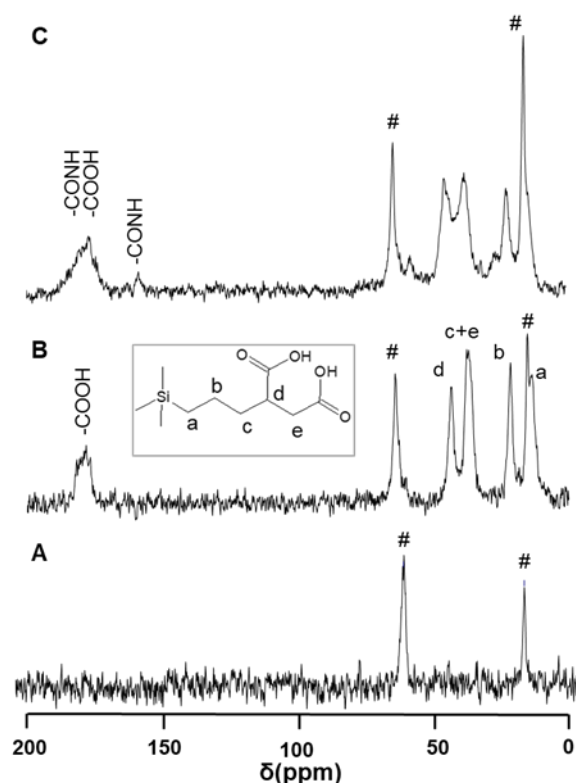


Figura III.46. Espectros de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  CP MAS NMR de materiales: **MSNs** (A), **MSNs-COOH<sub>ext</sub>** (B) y **MSNs-LprG** (C). Los picos designados con # corresponden a grupos etoxi debido a una hidrólisis y condensación incompleta

La espectroscopia de  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR en estado sólido permite conocer las modificaciones de la red de sílice a lo largo de las distintas funcionalizaciones que se realizan sobre el material de partida. Los espectros obtenidos se muestran en la Figura III.47, izquierda. Además, se registraron los espectros de  $^{29}\text{Si}$  CP MAS NMR (Figura III.47, derecha) para conocer con mayor detalle la presencia de las unidades  $\text{T}^n$ , que confirman la funcionalización de la superficie de los materiales. Como se puede observar en la Figura III.47, la introducción de los grupos ácidos provoca la aparición de las unidades  $\text{T}^2$  [ $\text{R-Si}(\text{OSi})_2(\text{OX})$ ] y  $\text{T}^3$  [ $\text{R-Si}(\text{OSi})_3$ ] que corresponden con las señales a -57 y -66 ppm, respectivamente, en los espectros CP del material **MSNs-COOH<sub>ext</sub>**, tal y como se ha comentado anteriormente. Y a su vez se puede observar la disminución de las áreas de los entornos  $\text{Q}^2$  y  $\text{Q}^3$  y un aumento de la población  $\text{Q}^4$  debido a la conversión de Si-OH a especies Si-O-Si totalmente condensadas.

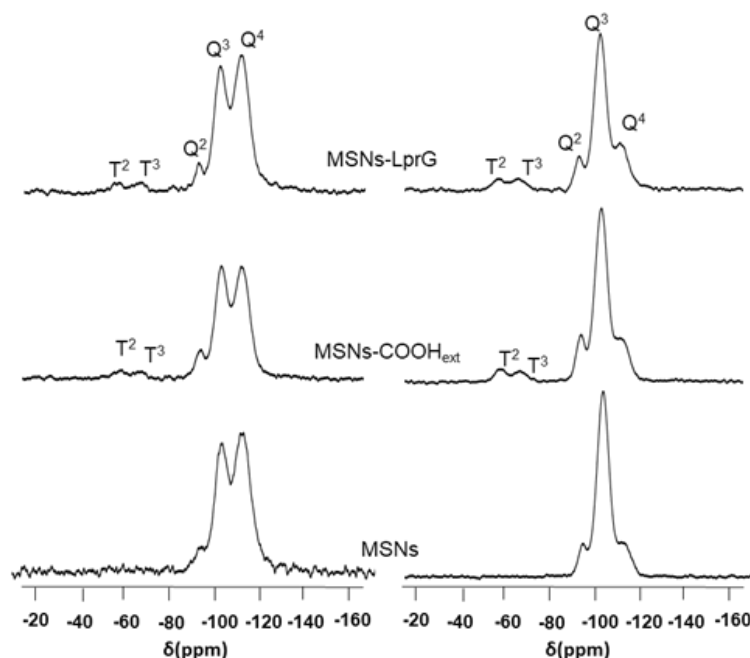


Figura III.47. Espectros de  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR (izquierda) y  $^{29}\text{Si}$  CP MAS NMR (derecha) de **MSNs**, **MSNs-COOH<sub>ext</sub>** y **MSNs-LprG**.

Todos estos cambios se muestran numéricamente en la Tabla III-17, que permiten además confirmar la funcionalización externa de la superficie de los materiales ya que como se observa en los valores de la proporción relativa de los entornos de silicio parcialmente condensados frente a los condensados por completo,  $(\text{Q}^2 + \text{Q}^3)/\text{Q}^4$ , en el material **MSNs-COOH<sub>ext</sub>**, la superficie interna de los canales se preserva puesto que no desaparecen totalmente las señales  $\text{Q}^2$  y  $\text{Q}^3$ , correspondiendo a los Si-OH del interior de los poros. La incorporación de la proteína, no produce cambios en las poblaciones de los entornos  $\text{Q}^n$ , que se mantienen en

comparación con el material anterior, **MSNs-COOH<sub>ext</sub>**, confirmándose así la unión de la proteína a través de los grupos de ácido carboxílico sin implicar emplazamientos de silicio. Este hecho se corrobora mediante la relación de los entornos  $Q^n/T^n$ , la cual se mantiene cuando se compara el material final **MSNs-LprG** con su predecesor.

Tabla III-17. Valores de los desplazamientos químicos y las poblaciones (%) de los entornos  $Q^n$  y  $T^n$  del silicio, así como de las relaciones de área de pico,  $(Q^2 + Q^3)/Q^4$  y  $Q^n/T^n$ , en función de la deconvolución de los espectros de  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR de los materiales MSNs.

Material	$\delta$ , ppm (peak area, %)				$\delta$ (ppm)		peak area
	$Q^2$	$Q^3$	$Q^4$		$T^2$	$T^3$	$Q/T$
<b>MSNs</b>	-93.2 (6.2)	-102.3 (44.6)	-112.0 (49.1)	1.0	---	---	---
<b>MSNs-COOH<sub>ext</sub></b>	-93.6 (3.2)	-102.7 (36.5)	-112.0 (60.2)	0.6	-57.8	-66.9	15.3
<b>MSNs-LprG</b>	-93.7 (2.7)	-102.6 (35.5)	-112.5 (61.8)	0.6	-57.3	-66.7	15.2

#### III.2.d. Nanosistemas híbridos proteína-Ag.

Los nanosistemas híbridos proteína-Ag permiten aprovechar las características de las MSNs para conseguir sistemas de transporte de nanopartículas inorgánicas mediante el uso de proteínas de vectorización.

La obtención de este tipo de materiales, que contienen proteína y nanopartículas inorgánicas, requiere la secuencia sucesiva de diferentes pasos de síntesis. Se descarta la ruta en la que el anclaje de la biomolécula se llevaría a cabo sobre las MSNs que contienen las AgNPs en su estructura. Esto es debido a que todos los materiales MSNs con AgNPs o AgBrNPs sufren modificaciones en la distribución y tamaños de las AgNPs o AgBrNPs cuando se someten a tratamientos en medio acuoso. A modo de ejemplo se pueden ver los resultados obtenidos partiendo del material **MSNs-AgBrNPs** para su posterior modificación con grupos ácidos y finalmente con transferrina. Tal y como se observa en la Figura III.48, las pequeñas AgBrNPs dispersas sobre las MSNs (Figura III.48 A) sufren un proceso de modificación de tal forma que el material final presenta MSNs sin nanopartículas y aparece cúmulos de alto contraste que contienen Ag y Br. La heterogeneidad de este producto final da idea de las dificultades de obtener un producto híbrido homogéneo mediante esta ruta sintética.

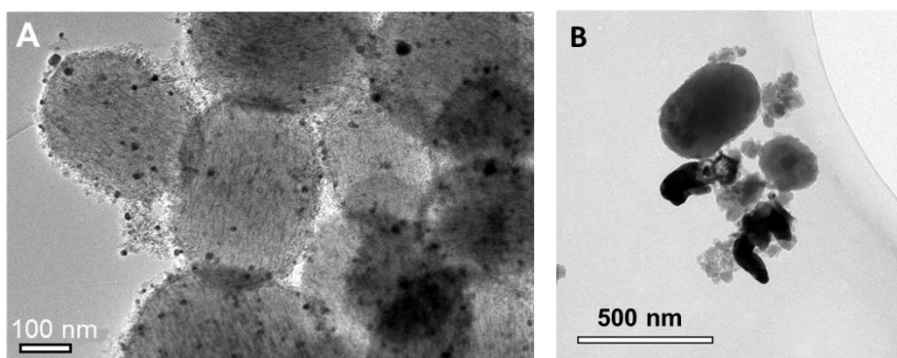


Figura III.48. Imágenes de TEM del material **MSNs-AgBrNPs** antes (A) y tras la funcionalización con grupos ácidos y posterior anclaje de la transferrina (B).

De igual modo que ocurre con las nanopartículas de AgBr, las AgNPs también sufren procesos de oxidación y reducción que hacen que su estabilización y dispersión sobre las MSNs, así como la distribución de sus tamaños, se vean modificados. Este hecho ya se comentó en el apartado III.2.b.1 donde se observó la simple modificación de los materiales **MSNs-AgNPs** tras un tratamiento en agua, sin llegar siquiera a la introducción de nuevos pasos de síntesis.

En base a todos estos resultados se realiza un estudio sobre una estrategia de síntesis alternativa para la obtención de materiales híbridos. Teniendo en la estabilización de AgNPs sobre proteínas soportadas en ciertos materiales<sup>218,219</sup>, la estrategia seguida para la obtención de los materiales híbridos se basa en la nucleación de las nanopartículas inorgánica en el último paso de síntesis sobre los materiales funcionalizados con proteínas. Éstas sirven como agentes para estabilizar los iones precursores de las nanopartículas, así como para la función concreta que realiza cada proteína en el nanosistema. Por ello la reducción de los iones precursores se lleva a cabo mediante métodos químicos que no afecten a la naturaleza de las biomoléculas, ni provoquen la degradación de las mismas como ocurriría con una reducción térmica. A modo general se muestra el proceso completo de obtención de **MSNs-BSA-AgNPs** y **MSNs-Tf-AgNPs** en la Figura III.49.



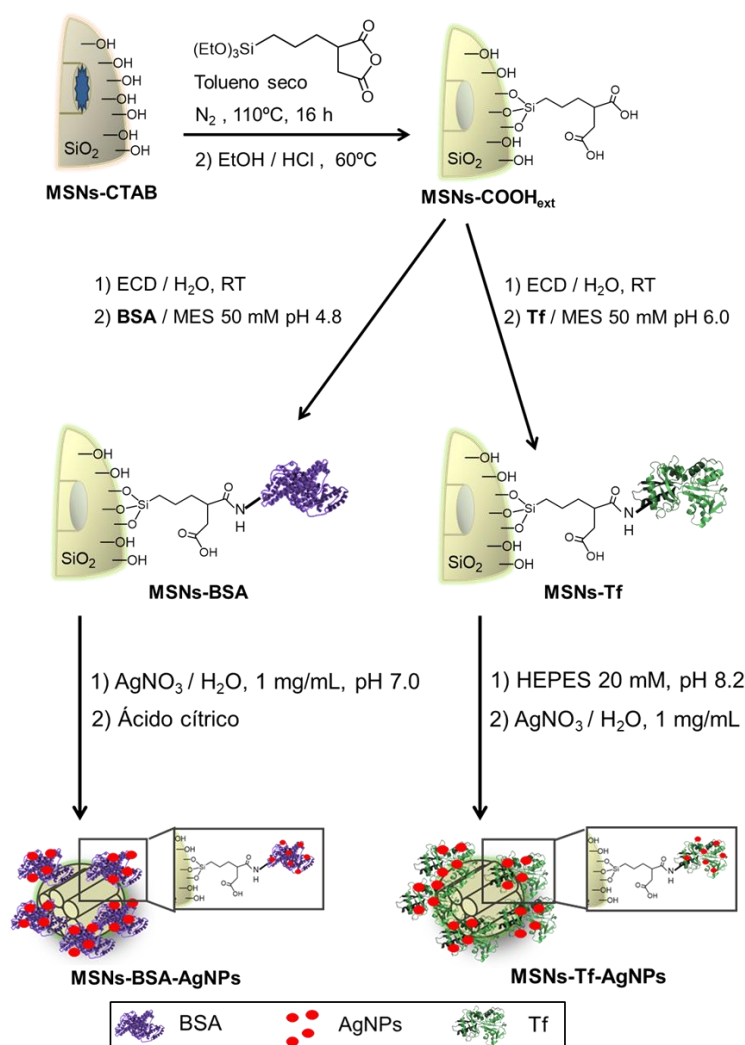


Figura III.49. Esquema completo de síntesis de los nanosistemas híbridos **MSNs-BSA-AgNPs** y **MSNs-Tf-AgNPs**.

#### III.2.d.1. Optimización del proceso de nucleación de nanopartículas de plata sobre **MSNs-BSA**.

Para la nucleación de AgNPs sobre el material **MSNs-BSA** se establece una complejación de los iones  $\text{Ag}^+$  y una posterior reducción de los mismos mediante ácido cítrico, tal y como se muestra en la Figura III.49.

Para que la complejación sea efectiva la proteína BSA, que presenta un pI de 5.87, se encuentra con los grupos ácidos de su estructura cargados negativamente. Los aminoácidos que presentan estos grupos son el ácido glutámico (Glu) y el ácido aspártico (Asp), y serán, por tanto, los responsables de la complejación del catión  $\text{Ag}^+$ . Por ello, inicialmente el material con proteína se dispersa en agua (pH 7) lo que permite que ese a ese pH superior al pI los residuos ácidos estén cargados negativamente. Posteriormente se adiciona el precursor iónico y es cuando se produce la complejación de los iones. El agente reductor se añade una vez que los iones se encuentran localizados sobre la superficie de las MSNs. Esto asegura que la formación

de las nanopartículas tenga lugar sobre la superficie de los materiales. Además, es importante destacar que el anclaje de las proteínas sobre los materiales funcionalizados con grupos ácidos no suponen una conversión total de los mismos, quedando algunos grupos  $\text{-COOH}$  en superficie que al pH de la reacción se encuentran cargados negativamente (pKa alrededor de 4.8 para ácidos carboxílicos en cadenas de 3 a 6 carbonos) ofreciendo más puntos de complejación de los  $\text{Ag}^+$  sobre las MSNs.<sup>220</sup>

En este proceso de síntesis se lleva a cabo una optimización de la cantidad de precursor iónico de plata a emplear. En todos los casos se asegura un exceso de moles de  $\text{Ag}^+$  con respecto a los moles de grupos ácidos que se encuentran en la superficie de las MSNs, aportados tanto por la proteína como por la funcionalización previa con el reactivo TEPSPA ( $9.7 \times 10^{-4}$  moles de  $\text{-COOH}$  /g **MSNs-BSA**). El número de moles de los grupos ácidos que aporta la proteína se pueden estimar mediante la composición de aminoácidos con grupos ácidos carboxílicos que conforman la misma, pero no se pueden confirmar aquellos que se encuentran disponibles para la complejación de iones y la nucleación de AgNPs. De tal forma que se realiza una primera síntesis partiendo de una disolución de  $\text{AgNO}_3$  (15 mg/mL) para llegar a obtener una concentración final del catión  $\text{Ag}^+$  de 5 mg/mL. Como se puede observar en la Figura III.50 la muestra obtenida es muy heterogénea porque se pueden encontrar regiones con cúmulos de Ag (Figura III.50 A) y otras con **MSNs-BSA** que presentan una deposición homogénea de AgNPs (Figura III.50 B). En base a estos resultados obtenidos se reduce la cantidad del precursor inorgánico para llegar a una concentración final de 0.42 mg/mL, aunque se mantenga un exceso con una relación 20:1 Ag:gr.-COOH. Las imágenes del material obtenido en este caso muestran un producto más homogéneo (Figura III.50 C) y una buena nucleación de AgNPs que se encuentran soportadas sobre el material MSNs-BSA (Figura III.50 D).

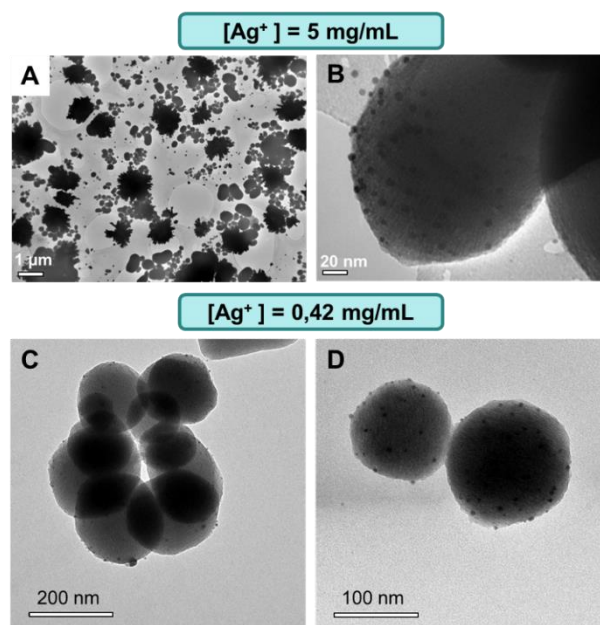


Figura III.50. Imágenes de TEM del proceso de optimización de la cantidad de precursor. Imágenes de los materiales **MSNs-BSA-AgNPs** para una  $C_{Ag}$  de 5 mg/mL (A y B) y de 0.42 mg/mL (C y D).

#### III.2.d.2. Optimización del proceso de nucleación de nanopartículas de plata sobre **MSNs-Tf**.

La nucleación de las AgNPs sobre el material que contiene Tf requiere la modificación de la ruta sintética ya que, uno de los factores más influyentes para obtener un material homogéneo y que las nanopartículas se encuentren bien distribuidas por la estructura de las MSNs, es el punto isoeléctrico de la proteína. La obtención de la ruta sintética adecuada conlleva un proceso de estudio de los productos obtenidos mediante distintas rutas.

En primer lugar y siguiendo las mismas condiciones que las comentadas anteriormente, si la nucleación de AgNPs se lleva a cabo empleando una cantidad elevada del precursor  $AgNO_3$  ( $C_{Ag} = 5$  mg/mL), suponiendo un elevado exceso de iones plata con respecto a la cantidad estequiométrica para los grupos  $-COOH$  presentes en la MSNs, y ácido cítrico como agente reductor, se obtiene un producto similar al homólogo anterior, presentando cúmulos de Ag (Figura III.51 A) y en algunos casos AgNPs formando agrupaciones (Figura III.51 B).

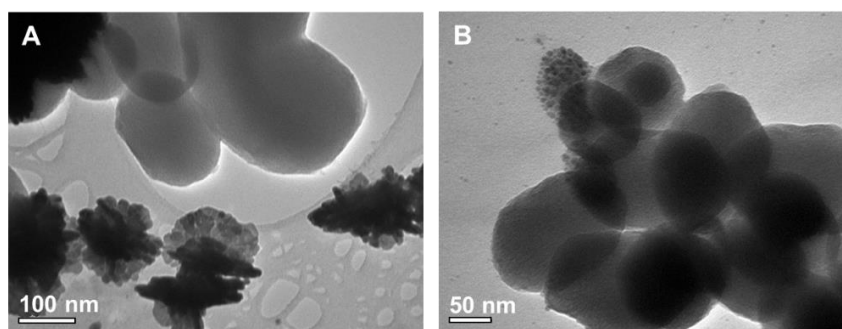


Figura III.51. Imágenes de TEM de la nucleación de AgNPs ( $C_{Ag} = 5 \text{ mg/mL}$ ) sobre los materiales **MSNs-Tf**.

En base a estos resultados, y de igual modo que se procedió en el caso de la BSA, se reduce la cantidad del precursor iónico. Sin embargo, en este caso, no se obtiene el producto homogéneo deseado. Tal y como se observa en la Figura III.52, solo existen algunas AgNPs sobre las nanopartículas mesoporosas y algunas de éstas no presentan incorporación de las nanopartículas inorgánicas.

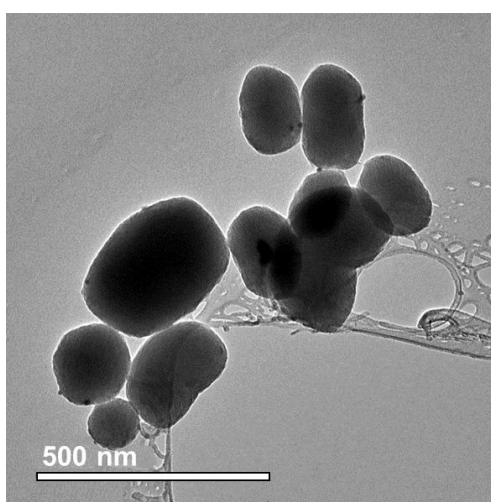


Figura III.52. Imágenes de TEM de la nucleación de AgNPs ( $C_{Ag} = 0.42 \text{ mg/mL}$ ) sobre el material **MSNs-Tf**.

Este hecho puede explicarse por la diferencia de punto isoelectrico entre la BSA ( $pI_{BSA} = 5.87$ ) y la Tf ( $pI_{Tf} = 6.97$ ). De tal forma que, cuando se realiza la nucleación en agua (pH 7), la BSA muestra los residuos de Asp y Glu cargados negativamente, pero la Tf se encuentra prácticamente neutra. Por ello es necesario el control del pH por encima del valor del pI. Así, la estrategia de nucleación para los materiales que contienen esta proteína se basan en el empleo de una disolución reguladora de HEPES a una concentración 20 mM, dentro de los valores empleados en ensayos biológicos, que además de establecer el pH adecuado sirve como agente reductor.<sup>221-223</sup> El esquema de síntesis optimizado se muestra en la Figura III.49.

Dentro de esta ruta sintética se lleva a cabo una optimización de la cantidad de ion precursor. En primer lugar, se emplea la concentración optimizada para el caso de los materiales con BSA ( $C_{Ag} = 0.42 \text{ mg/mL}$ ) obteniéndose un producto heterogéneo en donde algunos MSNs presentan proteína pero no AgNPs (Figura III.53 A) y otros se encuentran saturados de AgNPs (Figura III.53 B). Por ello se decide aumentar ligeramente la cantidad de  $\text{AgNO}_3$  a  $0.59 \text{ mg/mL}$ , lo que finalmente da lugar a un producto homogéneo con una buena distribución de las AgNPs sobre los materiales mesoporosos (Figura III.53 C y D). Esta última concentración asegura de igual modo el exceso del ion plata (50:1  $\text{Ag}^+:\text{-COOH}$ ), aunque supone un aumento con respecto a la cantidad empleada en el caso de la BSA. Sin embargo, el empleo de diferentes agentes reductores hace que no sea comparable la cantidad de  $\text{Ag}^+$  empleada con cada proteína para la obtención del material deseado.

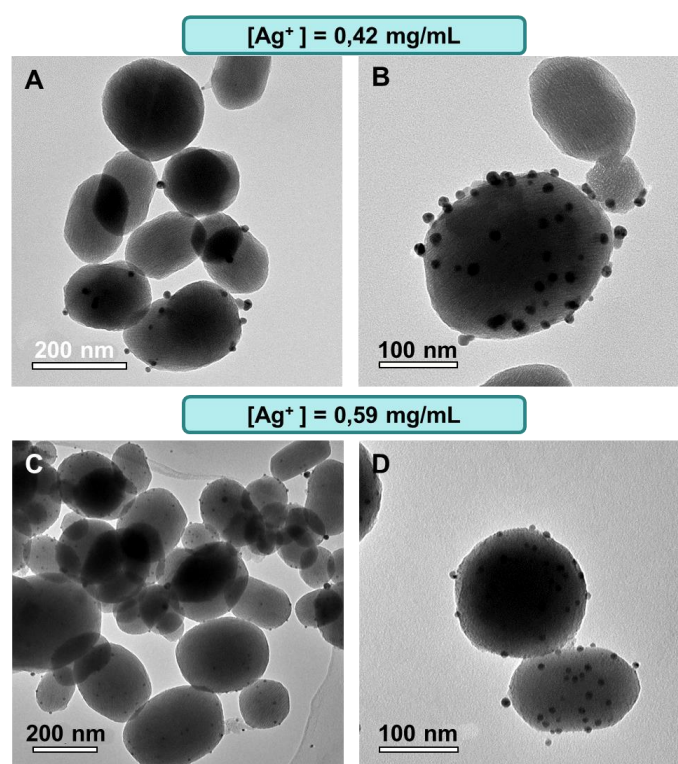
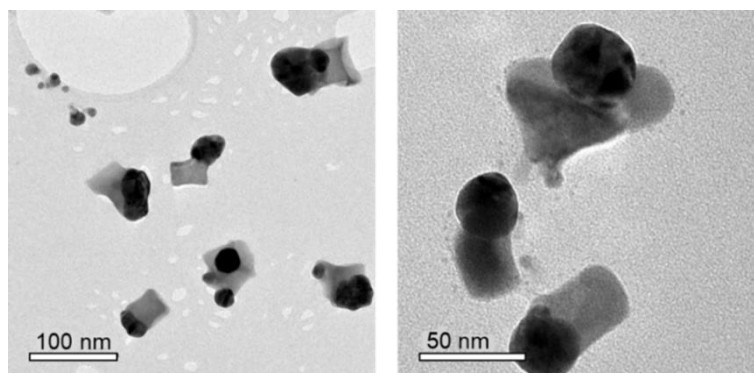


Figura III.53. Imágenes de TEM de la nucleación de AgNPs sobre **MSNs-Tf** empleando  $C_{Ag} = 0.42 \text{ mg/mL}$  (A y B) o  $C_{Ag} = 0.59 \text{ mg/mL}$  (C y D).

Es importante destacar que la optimización de estas rutas sintéticas para la obtención de nanosistemas híbridos es esencial para poder realizar el transporte activo y la vectorización de dichas nanopartículas ya que cuando se realiza la síntesis de nanopartículas de plata utilizando la proteína libre como plantilla no se obtienen buenos resultados. Como puede observarse en la Figura III.54, este enfoque sintético da lugar a conglomerados de plata no homogéneos. Lo cual pone de manifiesto la necesidad de utilizar el nanosistema de sílice

mesoporosa funcionalizada con grupos -COOH y decorada con una proteína como plataforma para la nucleación de las AgNPs, así como para la vectorización de dichas nanopartículas.



*Figura III.54. Imágenes de TEM de los conglomerados de plata formados cuando se emplea la Tf libre como estabilizante.*

#### III.2.d.3. Comparación de los materiales que contiene AgNPs y diferentes proteínas (BSA y Tf).

Una vez que se obtienen las rutas optimizadas para los dos materiales híbridos que contienen AgNPs se realiza un estudio comparativo mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM), para ver las diferencias morfológicas de ambos materiales y el tamaño de las nanopartículas obtenidas, por análisis EDS, para conocer el contenido de % atómico de ambos materiales, y por medidas de dispersión dinámica de luz para conocer la distribución de tamaños hidrodinámicos así como los valores de potencial  $\zeta$ .

Las micrografías obtenidas por TEM de los materiales (Figura III.55 A y B) muestran una distribución homogénea de las nanopartículas de plata en la superficie de ambos materiales finales, **MSNs-BSA-AgNPs** y **MSNs-Tf-AgNPs**. Y no se observan diferencias estructurales entre ambos materiales. Las nanopartículas metálicas presentan, en ambos casos, tamaños homogéneos alrededor de 15 nm (Figura III.55 C). Además, no se observan AgNPs libres, lo que indica que la nucleación y crecimiento de las AgNPs tiene lugar en la superficie externa de las MSNs covalentemente funcionalizados con las proteínas. Estos resultados también se verifican mediante las medidas del tamaño hidrodinámico obtenidas mediante DLS (Tabla III-18) donde sólo se encuentra una población alrededor de 196 nm, correspondiente a todo el nanosistema en ambos casos. Además, la ausencia de una población de alrededor de 20 nm indica que en suspensión acuosa las AgNPs no se liberan del nanosistema de sílice mesoporosa modificado con proteínas. Ambos nanosistemas híbridos presentan el máximo de la distribución de tamaños hidrodinámicos desplazado a un valor ligeramente superior al de los materiales precursores, MSNs-Proteína, correspondientes. Este



efecto se debe probablemente a que las MSNs-Proteína-AgNPs presentan un valor potencial menos negativo que precursores, es decir, algo más lejos de la zona de estabilidad coloidal.

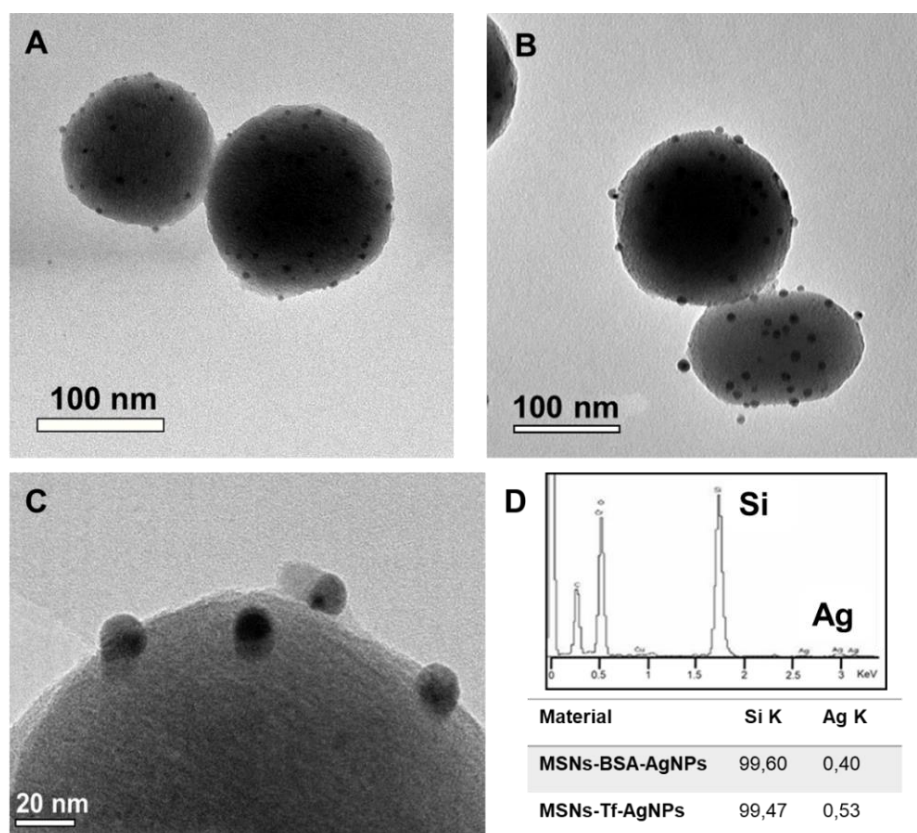


Figura III.55. Imágenes de TEM del material **MSNs-BSA-AgNPs** (A) y **MSNs-Tf-AgNPs** (B). Ampliación de AgNPs soportadas en la estructura mesoporosa (C). Análisis EDS y valores de % atómico de Si y Ag para cada uno de los materiales (D).

Tabla III-18. Valores de potencial  $\zeta$  y tamaño hidrodinámico de partícula en agua de las MSNs híbridos.

Material	Potencial $\zeta$	Tamaño hidrodinámico <sup>a</sup>
MSNs-BSA	-21 ± 3	166 ± 33
MSNs-Tf	-20 ± 4	166 ± 16
MSNs-BSA-AgNPs	-13 ± 7	197 ± 21
MSNs-Tf-AgNPs	-8 ± 3	196 ± 12

<sup>a</sup> Los datos corresponden con el máximo de la distribución de tamaños medida por DLS.

El análisis EDS de ambos materiales híbridos proporciona una relación molar de 0.004 Ag/Si para el material **MSNs-BSA-AgNPs** y una relación molar de 0.005 Ag/Si para el material **MSNs-Tf-AgNPs** (Figura III.55 D). Así, la relación molar de Ag/Si para ambos materiales es

comparable, representando un contenido similar en plata, independientemente de la proteína adherida. Este resultado también apoya la participación de los grupos de ácido carboxílico de la superficie externa de los materiales MSNs-Proteína, además de la proteína misma, en la localización de cationes de plata para su posterior reducción y nucleación.





**CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN  
BIOFUNCIONAL Y APLICACIONES  
BIOMÉDICAS DE  
NANOMATERIALES**

---



En este capítulo se describen los resultados obtenidos en el estudio de las caracterizaciones biofuncionales y las aplicaciones en nanomedicina, en concreto en la enfermedad de la tuberculosis y en la del cáncer, de los nanosistemas diseñados en la presente Tesis y mostrados en el capítulo anterior.



## IV.1. MATERIALES Y MÉTODOS

### *IV.1.a. Cultivos celulares*

Las líneas celulares empleadas en la presente Tesis Doctoral engloban tanto líneas celulares humanas como de ratón.

Los ensayos de toxicidad de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  se realizan sobre una línea celular de queratinocitos humanos (línea celular HaCaT). Esta línea celular permanente y no tumorigénica se caracteriza por preservar la capacidad de diferenciación y una alta estabilidad.<sup>224</sup> El crecimiento es adherente y se asemeja a una arquitectura epidérmica regular. Esta misma línea se emplea junto con la línea celular HepG2 de hepatocarcinoma humano para el estudio de biocompatibilidad y aplicabilidad de los nanosistemas desarrollados para vectorización activa. La línea celular HepG2 deriva de un carcinoma de hígado, pero no presenta capacidades tumorigénicas. Finalmente, para los estudios de los nanosistemas que contienen proteínas inmunomoduladoras se emplea una línea celular murina, en concreto una línea de macrófagos denominada RAW 264.7.

En todos los casos, los cultivos se mantienen en medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco) y 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich), a 37 °C con una atmósfera que contiene un 5% de  $\text{CO}_2$ .

### *IV.1.b. Cultivo bacteriano*

La cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) se cultiva en medio Middlebrook 7H9 suplementado con un 10% (v/v) de medio de enriquecimiento OADC (Becton Dickinson Microbiology Systems, Spark, MD), 0.5% (v/v) glicerol y con o sin Tyloxapol 0.05% (v/v; Sigma). Para los experimentos de concentración mínima inhibitoria (MIC) se realiza el cultivo de *M. tuberculosis* en ausencia de Tyloxapol.

### *IV.1.c. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)*

El ensayo para la determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) se lleva a cabo para la evaluación de la capacidad bactericida de distintos materiales basados en MSNs y especies de plata. La cepa H37Rv de *M. tuberculosis* se cultiva a una densidad inicial de  $1 \times 10^5$  bacterias/mL en un medio de 7H9 complementado con las concentraciones indicadas de nanopartículas. Las placas son incubadas durante 4 semanas a 37 °C. El crecimiento de micobacterias se determina midiendo la densidad óptica a 570 nm. La MIC se determina como la concentración mínima de las nanopartículas que impiden el crecimiento.

### *IV.1.d. Ensayos de evaluación de viabilidad celular*

#### IV.1.d.1. Evaluación de viabilidad celular tras el tratamiento con nanopartículas de $\text{TiO}_2$

Para la evaluación del potencial citotóxico de las  **$\text{TiO}_2$ -NPs** se requiere el empleo de distintos tipos de ensayos y optimizaciones de los mismos, ya que estas nanopartículas dan lugar a interferencias en algunos de los ensayos típicos de evaluación de viabilidad.

En primer lugar, se lleva a cabo un ensayo MTT tradicional donde se siembran las células HaCaT en placas multipocillos P96. Estos cultivos son tratados con 0.1, 1, 10  $\mu\text{g/mL}$  de  **$\text{TiO}_2$ -NPs** durante 24, 48 y 72 h. Transcurrido el tiempo de exposición deseado se añaden 20  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL) a cada pocillo y se incuba durante 5 h a 37 °C. Posteriormente, se elimina la disolución de MTT y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver el formazán, producto de reducción insoluble del MTT. Tras 15 min de incubación a temperatura ambiente se mide la absorbancia del formazán solubilizado en DMSO a 595 nm. La viabilidad celular se calcula relacionando la absorbancia de las células expuestas a  **$\text{TiO}_2$ -NPs** con la absorbancia de las células control.

En base a los resultados obtenidos en un primer ensayo MTT y con el fin de encontrar un método adecuado, se lleva a cabo un ensayo de exclusión de colorantes, en concreto se emplea el azul de tripano. Para ello, las células HaCaT son sembradas en placas multipocillos (P6) y posteriormente expuestas a 10 y 30  $\mu\text{g/mL}$  de  **$\text{TiO}_2$ -NPs** (anatasa y rutilo) durante 72 h. A continuación, las monocapas de células son tripsinizadas y, sobre una alícuota de 40  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular, se añaden 4  $\mu\text{L}$  de azul de tripano. Por último, se coloca la mezcla obtenida en el hemocitómetro (cámara de Neubauer) para el conteo de células viables (sin teñir) y células inviables (teñidas).

Finalmente, se evalúa la posibilidad de emplear el método basado en la conversión de sales de tetrazolio como el MTT, pero, en este caso, se incluye una modificación con una etapa adicional con respecto al protocolo tradicional. Así, las células HaCaT, sembradas en placas de 96 pocillos, se exponen a 1, 10, 30 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de  **$\text{TiO}_2$ -NPs** (anatasa) durante 72 h. A continuación, y tal y como se ha comentado previamente en el protocolo tradicional, se añaden 20  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL) a cada pocillo y se incuba durante 5 h a 37 °C. Posteriormente, se elimina la disolución de MTT y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de DMSO para disolver el formazán. Tras 15 min de incubación a temperatura ambiente, la placa se centrifuga y se toman 50  $\mu\text{L}$  de cada pocillo para transferirlo a una nueva placa multipocillo, sin células ni restos de NPs. Finalmente se mide la absorbancia a 595 nm de esta nueva placa que contiene únicamente el formazán solubilizado en DMSO. La viabilidad celular se calcula a través de la relación entre la absorbancia de las células tratadas y la absorbancia de las células control.

#### IV.1.d.2. Evaluación de viabilidad celular tras el tratamiento con nanosistemas híbridos proteína-Ag

Para evaluar los cambios de viabilidad celular producidos por los nanosistemas híbridos proteína-Ag, así como los materiales predecesores que no contienen Ag, se lleva a cabo un ensayo MTT. En este caso, las células HaCaT y HepG2 se siembran en placas de 96 pocillos 24 h antes del experimento. Después de la adhesión celular, los cultivos se exponen a 10, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de los diferentes materiales (**MSNs**, **MSNs-BSA**, **MSNs-Tf**, **MSNs-BSA-AgNPs** y **MSNs-Tf-AgNPs**) durante 24, 48 y 72 h. A continuación, se añaden 20  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL) a cada pocillo y se incuba durante 5 h a 37 °C. Posteriormente, se elimina la disolución de MTT y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de DMSO para disolver el formazán formado tras la reducción del MTT. Finalmente, se mide la absorbancia a 595 nm utilizando un lector de microplacas (TECAN) y se calcula la viabilidad celular a través de la relación entre la absorbancia de las células tratadas y la absorbancia de las células control.

#### IV.1.d.3. Evaluación de viabilidad celular tras el tratamiento con nanosistemas con proteínas inmunomoduladoras

Los ensayos de viabilidad celular con materiales que presentan las proteínas inmunomoduladoras frente a Mtb se realizan mediante el ensayo MTT, siguiendo un protocolo similar al descrito en el apartado anterior. Sin embargo, en este caso se emplea una línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, que son células que participan en la respuesta inmune, de tal forma que sirven como base de estudio para la activación de dicho sistema cuando se realiza un tratamiento con las nanopartículas.

Las células RAW 264.7 se siembran en placas multipocillos (P96) y posteriormente se exponen a 5, 10 y 50  $\mu\text{g/mL}$  de los materiales **MSNs**, **MSNs-Ag85B**, **MSNs-LprG** y **MSNs-LprA** durante 24 y 48 h. Transcurrido el tiempo de exposición a las nanopartículas, las monocapas son tratadas de igual forma que se ha comentado anteriormente con el reactivo MTT y posteriormente con DMSO para la solubilización del formazán, permitiendo la medida de la absorbancia a 595nm y la correspondencia de la misma con la viabilidad celular.

#### *IV.1.e. Ensayos basados en citometría de flujo*

##### IV.1.e.1. Evaluación del grado de apoptosis y el patrón del ciclo celular tras la exposición a nanopartículas de $\text{TiO}_2$

En ambos ensayos, las células HaCaT se siembran en placas P60 y se exponen a 10  $\mu\text{g/mL}$  de **TiO<sub>2</sub>-NPs** durante 72 h. A su vez, se siembran placas control sin tratamiento con las NPs.



Transcurrido ese tiempo, las monocapas de células son tripsinizadas para su posterior tratamiento.

Para el estudio del grado de apoptosis, las células tripsinizadas se suspenden en un tampón comercial (1x anexina-binding buffer preparado a partir del tampón comercial 5x; Kit de Invitrogen) y se determina la concentración celular mediante el hemocitómetro para tener  $1 \times 10^6$  células/mL en cada muestra. A continuación, se toman 100  $\mu$ L de la suspensión celular sobre los que se añaden 5  $\mu$ L de anexina-V conjugada con isocianato de fluoresceína (FITC) y 1  $\mu$ L de una disolución de yoduro de propidio (IP) de 100  $\mu$ g/mL (disolución comercial 1mg/mL). Se incuban las células a temperatura ambiente durante 15 min y posteriormente se añaden 400  $\mu$ L del tampón empleado anteriormente (1x anexina-binding buffer). A su vez, se preparan dos muestras como controles de la medida por citometría, una de ellas sin ningún marcaje y otra tratada únicamente con anexina-V. Las muestras se miden inmediatamente después con un citómetro de flujo.

Para el estudio del patrón del ciclo celular se determina la concentración celular para tomar  $1 \times 10^6$  células. Se centrifugan las muestras y se suspenden en 250  $\mu$ L de PBS. Sobre esa suspensión se añaden 250  $\mu$ L de una disolución con un 60% de etanol y 30  $\mu$ g/mL de reactivo Hoescht. Las muestras se incuban durante 1 h a temperatura ambiente, en ausencia de luz, y a continuación se analizan en el citómetro de flujo.

### IV.1.e.2. Evaluación de la internalización de nanosistemas con proteínas y nanosistemas híbridos proteína-Ag.

El estudio de internalización de los materiales híbridos proteína-Ag se inicia en primer lugar con un estudio del grado de internalización de los materiales predecesores, que solo contienen proteína. Para ello, las células HaCaT y HepG2 se siembran en placas de 6 pocillos y se exponen a 100  $\mu$ g/mL de los materiales **MSNs-BSA** y **MSNs-Tf** durante 24 h. Por otro lado, para evaluar el efecto de las nanopartículas metálicas en el grado de internalización, se prueban varias concentraciones (10, 25, 50  $\mu$ g/mL) de un material control (**MSNs**) y un material híbrido (**MSNs-Tf-AgNPs**) para diferentes tiempos de exposición (24 y 48 h).

En ambos casos, el procedimiento posterior a la exposición de las células a las NPs es el siguiente: el medio de cultivo se retira y se lavan las células con PBS para su tripsinización. Posteriormente, la reacción se detiene con medio de cultivo y las células se centrifugan a 300xg durante 5 min y se resuspenden en PBS para su análisis por citometría de flujo. Se añade azul de tripano (0.4%) para evitar la detección de fluorescencia correspondiente a las MSNs adheridos en la membrana externa de las células. El porcentaje de células que han

internalizado MSNs se cuantifica como la fracción de células positivas para fluoresceína entre el número total de células.

*IV.1.f. Ensayos basados en microscopia: cambios morfológicos y localización intracelular de nanopartículas.*

Los cambios y alteraciones producidas en la pared bacteriana tras la exposición a las **MSNs-AgBrNPs** se evalúan mediante criomicroscopía electrónica (CryoEM). Para ello se fijan mezclas de *M. tuberculosis* y una concentración subletal de las nanopartículas con glutaraldehído al 2% en 0.1 M de cacodilato a temperatura ambiente durante 2 h. Luego se incuban durante la noche en formaldehído al 4%, glutaraldehído al 1% y PBS al 0.1%. Las rejillas se preparan siguiendo procedimientos estándar y se observan a temperaturas de nitrógeno líquido en un microscopio electrónico de transmisión JEM-2200FS/CR (JEOL Europe, Croissy-sur-Seine, Francia) que funciona a 200 kV. Un filtro de energía omega en columna ayuda a grabar imágenes con una mejor relación señal/ruido mediante un filtro de pérdida cero. El ancho de la ranura de selección de energía se fija en 9 eV. Las imágenes digitales son grabadas en una cámara UltraScan4000 CCD, con una ampliación de 55058 y obteniendo un tamaño de píxel final de 2.7 Å/píxel.

Los cambios morfológicos del cultivo de células HaCaT tras el tratamiento con 10 µg/mL de **NPs-TiO<sub>2</sub>** se estudian mediante microscopía de contraste de fases. El estudio se realiza a distintos tiempos de exposición: 24, 48 y 72 h.

La localización de las NPs en el interior celular se evalúa mediante TEM. Para ello, las células HaCaT son expuestas a 10 µg/mL de **TiO<sub>2</sub>-NPs** durante 72 h y en el caso del estudio de los materiales híbridos proteína-Ag, las células HepG2 se exponen a dos concentraciones diferentes (10 y 25 µg/mL) del material **MSNs-Tf-AgNPs** durante 24 h.

A continuación, el procedimiento posterior es igual en ambos casos. En primer lugar, tras el tiempo de exposición a las NPs, las células son tripsinizadas y la suspensión celular se centrifuga para la realización de una etapa de lavado de dicha suspensión con PBS. Posteriormente, las células se fijan con una solución fijadora, la cual contiene un 2.5% de glutaraldehído y un 4% de p-formaldehído en PBS, durante 4 h a 4 °C. Después de 3 lavados con PBS, se resuspenden las muestras en PBS y se incuban durante toda la noche a 4 °C. Tras ese tiempo, se centrifugan para eliminar el PBS y se añade una disolución de 1% de tetraóxido de osmio en agua Milli-Q para su incubación a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, las muestras se lavan con agua Milli-Q y se lleva a cabo una etapa de deshidratación con un aumento progresivo del porcentaje de acetona en agua, en etapas consecutivas cada 10 min. La formación de la resina se realiza mediante el tratamiento con una

mezcla resina/acetona que va aumentando hasta un 100% de resina. Las muestras se dejan en un 100% de resina durante toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad, y tras la renovación de la alícuota de resina, se incuban a 67 °C durante 72 h, permitiendo así la solidificación de la misma. Finalmente, se cortan secciones ultrafinas de las muestras usando un ultramicrotomo y se depositan en rejillas de cobre para su tinción con acetato de uranilo y citrato de cromo. Las muestras obtenidas son analizadas por microscopía electrónica de transmisión (JEOL 1010, CNME).

### *IV.1.g. Ensayos de expresión génica: RT-qPCR*

Con el fin de profundizar en los efectos de las **TiO<sub>2</sub>-NPs** en la alteración del ciclo celular, se analizan los niveles de ARNm de ciertos genes relacionados con dicho proceso (Tabla IV-1) tras la exposición de las células HaCaT a dichas NPs. El ARN total se aísla empleando el reactivo TRIzol (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad de ARN extraído se mide espectrofotométricamente con el Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific). La síntesis del ADNc, previa eliminación del ADN genómico, se realiza mediante el kit de transcripción inversa Quantitect (Quiagen) utilizando 1 µg de ARN. La PCR con transcripción reversa a tiempo real (RT-qPCR) se lleva a cabo utilizando ensayos de expresión génica con sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific) y la correspondiente mezcla de reactivos necesaria para la reacción (TaqMan Fast advance master mix, Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las referencias de los ensayos de expresión génica empleados en la presente Tesis Doctoral se enumeran en la Tabla IV-1. Todas las reacciones se realizan en el volumen final de 10 µL. El protocolo de reacción fue de 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C para la activación de la polimerasa y 40 ciclos durante 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. La expresión relativa de los genes se normaliza usando GADPH como control endógeno y la expresión génica en cada muestra se calcula mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

Tabla IV-1. Genes relacionados con el ciclo celular, sus correspondientes secuencias y códigos ID de los ensayos Taqman.

Proteínas	Genes	Ref. Secuencia	ID ensayo
<b>Cdk1</b>	<b>CDK1</b>	NM_001170406.1	Hs00938777_m1
<b>Ciclina B1</b>	<b>CCNB1</b>	NM_031966.3	Hs01030099_m1
<b>Cdk2</b>	<b>CDK2</b>	NM_001290230.1	Hs01548894_m1
<b>Ciclina E</b>	<b>CCNE1</b>	NM_001238.3	Hs01026536_m1
<b>Ciclina A</b>	<b>CCNA2</b>	NM_001237.3	Hs00996788_m1
<b>p21</b>	<b>CDKN1A</b>	NM_000389.4	Hs00355782_m1
<b>p53</b>	<b>TP53</b>	NM_000546.5	Hs01034249_m1
<b>GADPH</b>	<b>GADPH</b>	NM_001256799.2	Hs03929097_g1

Este tipo de ensayo se emplea a su vez para la validación de los resultados obtenidos mediante la estrategia SILAC para la evaluación de la expresión diferencial de proteínas tras el tratamiento con el nanosistema **MSNs-Tf-AgNPs**. El procedimiento experimental es similar al comentado anteriormente y en la Tabla IV-2 se resumen los genes analizados en este caso.

Tabla IV-2. Genes seleccionados relacionados con los efectos del tratamiento con el nanosistema **MSNs-Tf-AgNPs**, sus correspondientes secuencias y códigos ID de los ensayos Taqman.

Proteínas	Genes	Ref. Secuencia	ID ensayo
<b>RCF3</b>	<b>RCF3</b>	NM_002915.3	Hs01082404_m1
<b>CHERP</b>	<b>CHERP</b>	NM_006387.5	Hs00197307_m1
<b>DDX3X</b>	<b>DDX3X</b>	NM_001193416.2	Hs00606179_m1
<b>SHMT2</b>	<b>SHMT2</b>	NM_001166356.1	Hs01059263_g1
<b>Ciclina E</b>	<b>CCNE1</b>	NM_001238.3	Hs01026536_m1
<b>Cdk2</b>	<b>CDK2</b>	NM_001290230.1	Hs01548894_m1
<b>GADPH</b>	<b>GADPH</b>	NM_001256799.2	Hs03929097_g1

### *IV.1.h. Ensayos de expresión proteica: Western blot y ELISA*

#### IV.1.h.1. Ensayo Western blot para la evaluación de la expresión proteica tras la exposición a nanopartículas de TiO<sub>2</sub>

Para la evaluación de la expresión proteica de determinadas proteínas especialmente relevantes en la regulación del ciclo celular se ha empleado el ensayo Western blot. Tras la exposición de las células a 10 µg/mL de **TiO<sub>2</sub>-NPs** se realiza un lisado de las mismas con un tampón de lisis total que contiene un cóctel de inhibidores de proteasas. De igual forma, se prepara un control de células sin tratamiento. La concentración de proteína total de cada muestra se determina mediante el método Bradford y posteriormente se procede a la separación de las mismas mediante electroforesis SDS-PAGE, empleando un gel de poliacrilamida al 12.5%. Las proteínas separadas se electrotransfieren a una membrana de nitrocelulosa (BioRad), que posteriormente se bloquea con leche al 3% en PBS-T (0.05% Tween-20) durante 1 h a temperatura ambiente. Después del bloqueo, se incuba la membrana con los anticuerpos primarios diluidos en el tampón de bloqueo: tubulina 1:500 (Sigma Aldrich) durante 1 h a temperatura ambiente y p21 1:200 (Santa Cruz) durante la noche a 4 °C. Después de tres lavados de 10 minutos, la membrana se incuba con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con HRP durante 1 h. Finalmente, la membrana se lava minuciosamente y se visualiza mediante quimioluminiscencia (ECL, GE Healthcare).

#### IV.1.h.2. Ensayo ELISA para evaluar los niveles de citoquinas producidas tras el tratamiento con nanosistemas funcionalizados con proteínas inmunomoduladoras.

Para evaluar la activación de las células RAW 264.7 por los nanomateriales sintetizados, las células se siembran en placas P60 y se exponen a 10 µg/mL de **MSNs-Ag85B**, **MSNs-LprG** y **MSNs-LprA** durante 24 h. Por otro lado, también se emplean como control positivo del experimento, lipopolisacáridos de *Escherichia Coli* (LPS) para inducir la activación. Las células se exponen a 100 ng/mL de LPS durante 24 h. Después de este tiempo, se recoge y congela el sobrenadante del medio de cultivo de cada placa. Para evaluar los niveles de la citoquina proinflamatoria TNF-α, se realiza el procedimiento ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (mouse TNF-α DuoSet ELISA kit, sistemas RyD) que se puede resumir en: un primer paso de tapizado de la placa con el anticuerpo de captura, y a continuación se cargan las muestras sin diluir y los patrones en la placa. Posteriormente, se añaden sucesivamente los anticuerpos de detección, la disolución de estreptavidina anclada a HRP, una disolución de TMB y la disolución para interrumpir la reacción que contiene H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Para obtener información de la ruta antiinflamatoria, se miden los niveles de citoquina IL-10 mediante ELISA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (mouse IL-10 ELISA kit, Novex Life

Technologies). Este procedimiento es similar al procedimiento descrito anteriormente, incluyendo un antígeno vinculante y pasos de detección. En ambos casos se mide la absorbancia a 450 nm y se cuantifica la cantidad de cada citoquina en las muestras a partir de las curvas de calibrado obtenidas.

#### *IV.1.i. Evaluación de la expresión diferencial de proteína: SILAC*

##### **IV.1.i.1. Experimento SILAC del lisado total de células expuestas a nanopartículas de TiO<sub>2</sub>**

La correcta cuantificación de proteínas mediante la estrategia SILAC requiere una incorporación completa de los aminoácidos marcados empleados. Por ello, en primer lugar, se lleva a cabo una verificación del marcaje de las proteínas. Así, las células HaCaT se mantienen en cultivo en dos poblaciones diferentes: población A, cuyo medio de cultivo contiene aminoácidos ligeros (<sup>12</sup>C<sub>6</sub>-Lys y <sup>12</sup>C<sub>6</sub>-Arg) y población B, cuyo medio de cultivo contiene aminoácidos pesados (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Lys y <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Arg). Tras 10 doblajes se lleva a cabo el lisado de las células de ambas poblaciones y posteriormente se separan las proteínas de cada una de ellas mediante SDS-PAGE para el posterior análisis mediante espectrometría de masas. La evaluación del marcaje se realiza mediante la comparación del perfil isotópico y los valores de m/z para una misma proteína en las dos poblaciones.

Una vez que se ha confirmado la incorporación completa de los aminoácidos, se lleva a cabo el experimento SILAC para la elucidación de los mecanismos biomoleculares asociados a los potenciales efectos citotóxicos de las **TiO<sub>2</sub>-NPs** (Figura IV.1). Las células HaCaT se exponen a 10 µg/mL de **TiO<sub>2</sub>-NPs** durante 72 h. A continuación, las células cultivadas en medios "pesado" y "ligero" se tripsinizan, se cuentan y se mezclan en una proporción 1:1 en número de células. La mezcla de ambas poblaciones se lisa con un tampón que contiene inhibidores de proteasas (Roche) y se determina la concentración de proteínas mediante el método Bradford. Posteriormente, las proteínas se separan mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%. Después de la electroforesis, las proteínas se visualizan mediante tinción con azul de Coomassie y el carril del gel que contiene todas las proteínas de la mezcla se corta horizontalmente en 22 secciones. Las bandas de gel obtenidas se destiñen mediante lavados con una mezcla 50:50 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM:acetonitrilo, y posteriormente se cortan en pequeños fragmentos que son deshidratados con acetonitrilo y secadas. Dichos fragmentos de gel se incuban con una disolución de tripsina 12.5 ng/µL en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM durante la noche a 37 °C. Tras la digestión, los péptidos se extraen empleando acetonitrilo y ácido fórmico al 5%, y se secan por centrifugación a vacío. Los péptidos extraídos de cada banda del gel, se reconstituyen en 12 µL de agua de calidad Masas con un 2% de acetonitrilo y un 0.1% de ácido fórmico.

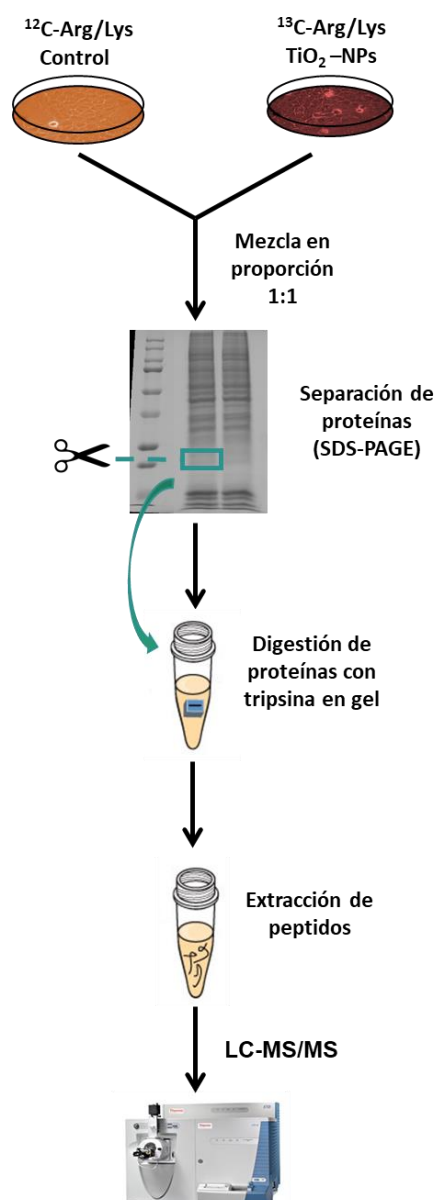


Figura IV.1. Esquema del procedimiento experimental del experimento SILAC.

La mezcla de péptidos de las diferentes fracciones se analiza utilizando un nanoLC-MS/MS. Los péptidos se cargan en una pre-columna C18 (0.3 x 10 mm, SGE) y posteriormente se separan en una columna analítica de fase inversa (75  $\mu\text{m}$  x 25 cm capilar de sílice fundida C18 HPLC PepMap column, 3  $\mu\text{m}$ , 100 Å, Thermo) con un gradiente lineal de 5-95% acetonitrilo en una solución acuosa al 0.1% de ácido fórmico. El gradiente se mantiene a lo largo de 120 min mediante un sistema nanoLC ultra 1D plus (Eksigent) a una velocidad de flujo de 200 nL/min, a través de la columna analítica hasta un emisor de nano-diámetro (Proxeon). Los péptidos son escaneados y fragmentados con un espectrómetro de masas de trampa de iones lineal LTQ XL (Thermo Scientific) que opera en modo de conmutación ZoomScan y MS/MS dependiente de los datos, usando los tres iones precursores más intensos detectados en un

análisis de 400 a 1600 u (tres análisis). La ventana de masa de ZoomScan se establece en 12 Da, permitiendo la monitorización de toda la envoltura isotópica  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  de la mayoría de los péptidos doble y triplemente cargados. En este caso se excluyen los iones con carga +1 para el análisis por MS/MS por no tratarse de péptidos.

El tratamiento de datos se lleva a cabo a partir de los archivos de cada medida (archivos *.raw*) que se convierten a archivos *.mgf*, los cuales se introducen en el motor de búsqueda MASCOT (v2.3 MatrixScience). La base de datos empleada, que contiene todas las secuencias, es NCBI *Homo sapiens*, la cual permite la identificación de las proteínas. Como criterios de búsqueda específicos se emplean la oxidación de metionina y los marcajes  $^{13}\text{C}_6$ -Arg y  $^{13}\text{C}_6$ -Lys como modificaciones variables, la tripsina como enzima específica y hasta un error de corte de la misma permitido, denominado “missed cleavage”. Además, se tiene en cuenta una tolerancia de masa para los precursores y para los fragmentos de iones de 1.2 y 0.3 Da, respectivamente. Para considerar la identificación de una proteína como válida, se requiere al menos un péptido rojo en negrita (único), es decir, el péptido con la puntuación más alta que coincida con la proteína con la puntuación total más alta, y se requirieron al menos dos péptidos rojos en negrita (únicos) para la cuantificación. Los valores mínimos de score MASCOT que se consideran válidos en la búsqueda MASCOT para péptidos y proteínas, se establecen en 40 ( $p < 0.05$ ) y 47 ( $p < 0.01$ ), respectivamente. La cuantificación relativa de las proteínas identificadas, se lleva a cabo en base al área de pico de las envolturas isotópicas mediante el programa Quixot (versión 1.3.26). Los espectros de MS empleados para la cuantificación se verifican manualmente en todos los casos. Los procesos funcionales y la localización subcelular de las proteínas identificadas por SILAC se asignan en base a la información biológica obtenida de la base de datos Gene Ontology (GO).

#### IV.1.i.2. Experimento SILAC con fraccionamiento de proteínas de membrana de células expuestas a nanopartículas de $\text{TiO}_2$

Este tipo de experimentos conlleva el procedimiento de marcaje metabólico SILAC, así como el procedimiento de separación y digestión de proteínas comentados anteriormente. Adicionalmente, se lleva a cabo una etapa intermedia de aislamiento de proteínas de membrana. El esquema completo del procedimiento experimental se muestra en la Figura IV.2.



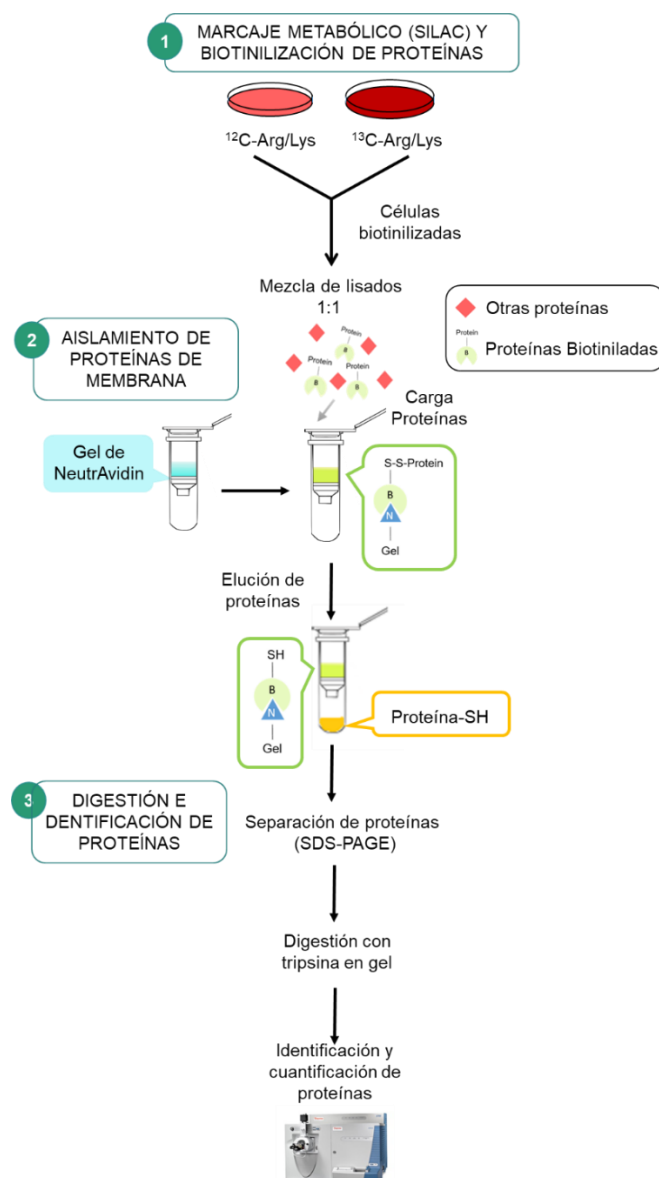
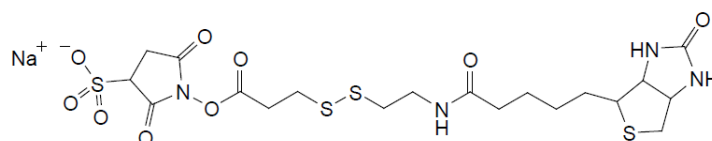


Figura IV.2. Esquema del procedimiento experimental del ensayo SILAC con fraccionamiento de proteínas de membrana.

Una vez que se ha realizado la incorporación completa de los aminoácidos marcados se lleva a cabo la exposición al agente de estudio. En la presente Tesis se mostrará el estudio de los efectos de **TiO<sub>2</sub>-NPs** sobre las proteínas de membrana de las células HaCaT.

Posteriormente, se procede al marcaje con biotina de las proteínas de membrana y su posterior aislamiento mediante el procedimiento experimental descrito por el fabricante (Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit, Thermo). Para ello, las células se lavan con PBS frío y se incuban durante 30 min con una disolución que contiene Sulfo-NHS-SS-biotina (Figura IV.3). Tras el tiempo de incubación se elimina el exceso de biotina y se mezclan ambas poblaciones celulares en relación 1:1. A continuación se lleva a cabo la lisis celular de la mezcla mediante un tampón de lisis que contiene inhibidores de proteasas. El lisado celular se carga en una

columna que contiene un gel de avidina modificada (NeutrAvidin), previamente inmovilizado, y se incuba mediante 1 h permitiendo la retención de las proteínas de membrana marcadas con biotina. Tras la etapa de retención se realizan lavados para la eliminación del resto de proteínas que contiene el lisado celular y posteriormente se procede a la elución de las proteínas retenidas empleando una disolución que contiene DTT. Este compuesto favorece la ruptura de las uniones S-S, liberando las proteínas para su posterior separación mediante SDS-PAGE. Las proteínas separadas son digeridas y analizadas siguiendo el mismo procedimiento comentado en el apartado IV.1.i.1.



*Figura IV.3. Estructura química de Sulfo-NHS-SS-Biotina [sulfosuccinimidil-2-(biotinamido) etil-1,3-ditiopropionato]*

#### IV.1.i.3. Experimento SILAC con fraccionamiento de proteínas de núcleo de células expuestas al material **MSNs-Tf-AgNPs**

En este caso se lleva a cabo un procedimiento de marcaje metabólico SILAC junto con un aislamiento de proteínas de núcleo para la posterior separación, digestión y análisis de las mismas. El esquema del procedimiento experimental del marcaje y el aislamiento de las proteínas se muestra en la Figura IV.4.

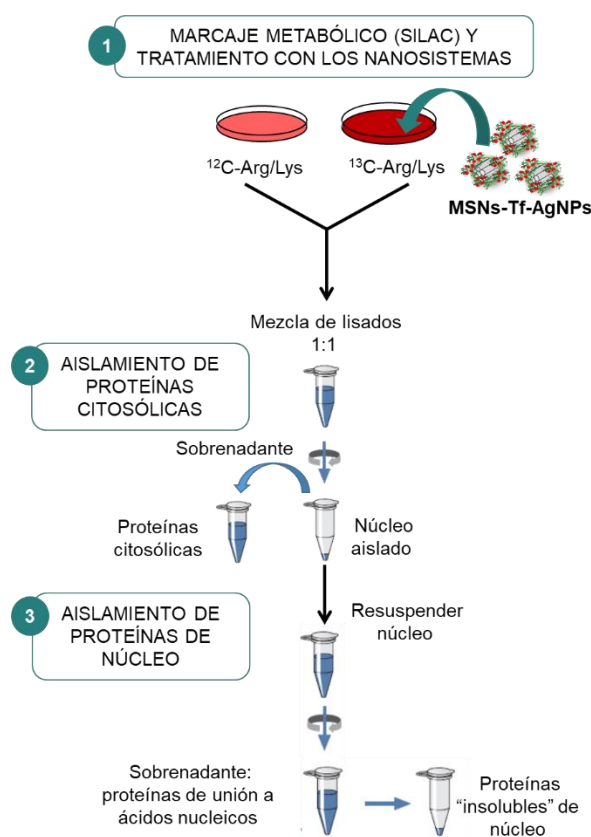


Figura IV.4. Esquema del procedimiento experimental del marcaje SILAC con aislamiento de proteínas de núcleo.

Una vez que se ha realizado la incorporación completa de los aminoácidos marcados se lleva a cabo el tratamiento con el material **MSNs-Tf-AgNPs** a una concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$  durante 48 h. Posteriormente se procede a la mezcla de ambas poblaciones en relación 1:1 y se lleva a cabo la lisis y fraccionamiento de las proteínas según las especificaciones del fabricante (Qproteome Nuclear Protein Kit, Qiagen). Las etapas del aislamiento conllevan una primera separación de las proteínas citosólicas, y posteriormente la fracción nuclear aislada se separa en proteínas unidas a ácidos nucleicos y proteínas "insolubles" que son aquellas que presentan uniones más fuertes con el ADN. La fracción de proteínas de unión a ácidos nucleicos se separa mediante SDS-PAGE y posteriormente se realiza un procedimiento análogo al descrito anteriormente para la digestión de proteínas y su posterior identificación y cuantificación.

## IV.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.2.a. Estudio comparativo de la capacidad bactericida de materiales con plata para el desarrollo de terapias contra *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)

El desarrollo de este estudio se centra en la capacidad bactericida que han demostrado los materiales basados en plata (Ag) y su potencial aplicación en tuberculosis, con objeto de diseñar nuevos fármacos capaces de combatir a cepas altamente resistentes a los fármacos habituales.

Por ello se realiza un estudio comparativo para evaluar la capacidad bactericida de los distintos materiales desarrollados y presentados en la presente Tesis (apartado III.2.b), los cuales se basan en un soporte biocompatible, las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs), para el transporte de nanopartículas de Ag.

#### IV.2.a.1. Evaluación de la capacidad bactericida *in vitro* sobre la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)

En primer lugar, se lleva a cabo un estudio de la capacidad bactericida de los materiales empleando suspensiones seriadas de **MSNs-AgNPs**, **MSNs-AgBrNPs** y **Ag@MSNs**, partiendo de una concentración inicial de 500 µg/mL de material. Los cultivos de bacteria son tratados directamente con dichas suspensiones y se determina la inhibición del crecimiento bacteriano mediante medida de la densidad óptica (OD). Los resultados obtenidos (Figura IV.5) muestran una inhibición del crecimiento bacteriano al aumentar la concentración de los materiales **MSNs-AgBrNPs** y **Ag@MSNs**, tal y como se observa en la reducción de la turbidez y con ello en la densidad óptica. Sin embargo, el material **MSNs-AgNPs** no provoca cambios aparentes en el cultivo a las concentraciones evaluadas.

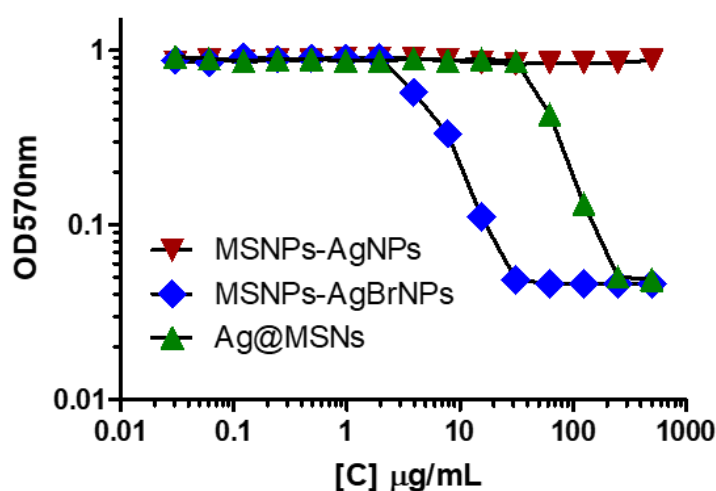


Figura IV.5. Capacidad bactericida de los materiales *MSNs-AgNPs*, *MSNs-AgBrNPs* y *Ag@MSNs* a diferentes concentraciones contra *Mtb* obtenida a partir de la medida de  $OD_{570nm}$ .

A nivel cuantitativo, se puede definir el valor de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los materiales evaluados como la concentración mínima que inhibe el crecimiento visible del microorganismo evaluado. De este modo el valor de MIC para el material **MSNs-AgNPs** no puede ser definido dentro de las concentraciones evaluadas. Por el contrario, el material **MSNs-AgBrNPs** presenta un valor de MIC de 31.25 µg/mL y el material **Ag@MSNs** un valor de 250 µg/mL (Figura IV.5 y Figura IV.6). Según estos resultados se puede confirmar la mejor capacidad bactericida del material **MSNs-AgBrNPs** frente a *Mtb* cuando se compara con los dos que presentan AgNPs. Estos resultados pueden respaldarse con los estudios previos desarrollados frente a diferentes tipos de bacterias donde se confirma que la estructura de la pared celular puede ser determinante en el mecanismo de acción de los agentes bactericidas, de tal forma que las nanopartículas comprometen la integridad de las membranas bacterianas aumentando la permeabilidad de las mismas.<sup>123</sup>

La mejor actividad de los materiales basados en AgBrNPs podría explicarse por el efecto dual de las propias AgBrNPs que interaccionan con la pared celular y los iones  $Ag^+$  que se liberan y son capaces de penetrar la pared.<sup>123,225</sup> Esa liberación de iones  $Ag^+$  se ve más favorecida en el material **MSNs-AgBrNPs** con respecto a los otros dos (**MSNs-AgNPs** y **Ag@MSNs**) ya que en este caso tienen que producirse procesos de oxidación para que la plata metálica ( $Ag^0$ ) libere iones  $Ag^+$ .<sup>126</sup>

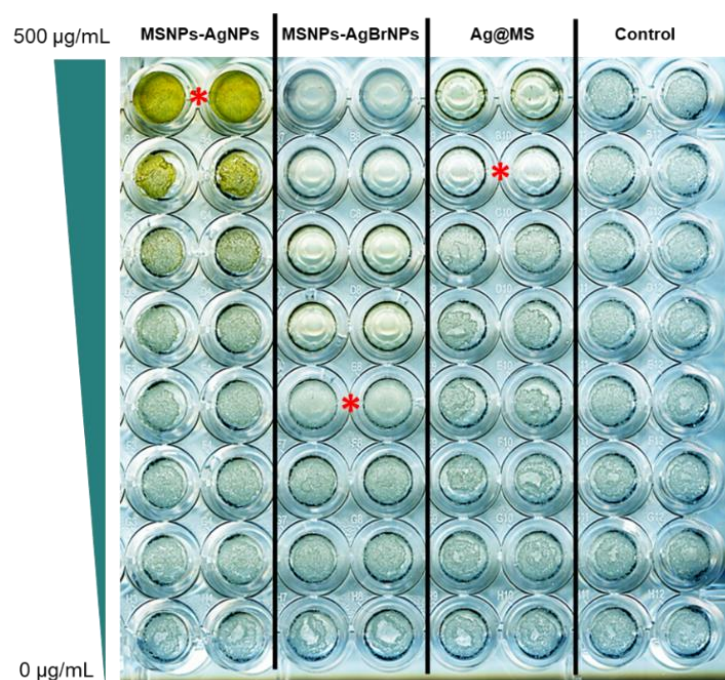


Figura IV.6. Crecimiento de la bacteria Mtb en cultivos a diferentes concentraciones de los materiales **MSNs-AgNPs**, **MSNs-AgBrNPs** y **Ag@MSNs**. \* muestran los valores de MIC.

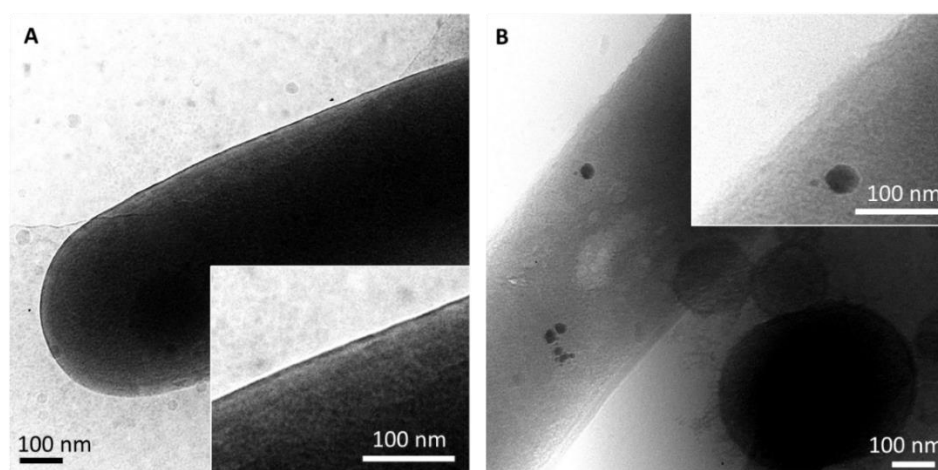
Es importante destacar que, en base a los contenidos atómicos de Ag en los tres materiales comentados en el apartado III.2.b.4, los materiales con capacidad bactericida (**MSNs-AgBrNPs** y **Ag@MSNs**) presentan un contenido comparable en torno al 3% de Ag, a diferencia del material **MSNs-AgNPs** que presenta un porcentaje superior (5.2% de Ag). Por lo que, a igualdad de concentraciones evaluadas, la efectividad observada de los materiales **MSNs-AgBrNPs** y **Ag@MSNs** frente a la del material **MSNs-AgNPs** supone mejor capacidad bactericida con un menor contenido de Ag.

La diferente capacidad bactericida de los dos materiales que presentan Ag, **MSNs-AgNPs** y **Ag@MSNs**, podría deberse a la diferente configuración de las partículas. El material **MSNs-AgNPs** presenta las AgNPs expuestas al medio, de tal forma que son más susceptibles a sufrir procesos de oxidación y liberar cationes  $\text{Ag}^+$ . Pero de igual forma, la exposición directa de las AgNPs al medio de cultivo puede hacer que la formación de una corona de proteínas alrededor de las partículas aumente su estabilidad. Este hecho reduciría los niveles de liberación de cationes  $\text{Ag}^+$  debido, por un lado, por la protección frente a la oxidación y por otro por el efecto complejante de los iones formados por parte de las proteínas. Además, la adsorción de biomoléculas, presentes en los medios de cultivo, sobre las partículas puede incrementar la agregación de las mismas impidiendo de nuevo la liberación de cationes plata.<sup>124</sup> Por lo tanto, la acción bactericida de dicho material, que vendría determinada por la cantidad de catión  $\text{Ag}^+$  libre, se encontraría reducida y podría explicar los resultados obtenidos. Sin embargo, las

partículas núcleo@corteza (**Ag@MSNs**) presentan la configuración idónea para que el recubrimiento de sílice sobre las AgNPs actúe como protección frente a la adsorción de proteínas sobre las propias nanopartículas de plata. Por ello la oxidación del núcleo de  $\text{Ag}^0$  y la liberación de los cationes  $\text{Ag}^+$  puede realizarse de forma continuada permitiendo que, al menos parte de los cationes liberados lleguen a interaccionar con la bacteria. Estos hechos tendrían que ser confirmados mediante estudios de liberación del catión  $\text{Ag}^+$  en las condiciones de estudio para los dos materiales. Pero ensayos desarrollados hasta la fecha con AgNPs en distintos medios han demostrado la implicación de la corona de proteínas sobre la liberación de los cationes plata y en definitiva sobre la efectividad y toxicidad de los mismos.<sup>226,227</sup>

### IV.2.a.2. Evaluación de los cambios producidos en la pared bacteriana tras el tratamiento con los nanosistemas

Con el fin de profundizar en la capacidad bactericida del material **MSNs-AgBrNPs**, se lleva a cabo un estudio de evaluación de los cambios morfológicos producidos en la superficie de la bacteria tras el tratamiento con el nanosistema. Las imágenes de criomicroscopía (Figura IV.7) muestran cómo el cultivo control de la bacteria presenta una morfología de la superficie celular intacta y, sin embargo, el cultivo tratado con el nanosistema presenta nanopartículas adsorbidas en la superficie de la bacteria y daño en la pared de la misma, que incluye tanto la membrana externa como interna. Como se observan en las imágenes insertadas, la pared de las bacterias tratadas con el nanosistema no se encuentra bien definida como sí ocurre en el caso de la bacteria control, indicando la efectividad del nanosistema en comprometer la integridad de la superficie de Mtb.



*Figura IV.7. Imágenes de Criomicroscopía electrónica para la evaluación del daño en la superficie celular de Mycobacterium tuberculosis por MSNs-AgBrNPs tras 24h, a una concentración subletal. Células de M. tuberculosis no tratadas con una morfología de la superficie celular intacta (A). Células de M. tuberculosis tratadas que muestran daño en la pared celular (B). Las imágenes insertadas muestran detalles de la morfología de la superficie de la célula.*



### IV.2.b. Evaluación de nanosistemas con proteínas inmunomoduladoras para su aplicación como vacunas.

El presente estudio se centra en el desarrollo de nanovacunas basadas en la aplicación de los materiales mesoporosos, en concreto las MSNs, como adyuvantes de proteínas implicadas en la activación del sistema inmune y relacionadas con las vesículas secretadas por Mtb. Dentro de estas proteínas se seleccionan el antígeno 85B (Ag85B) y dos lipoproteínas (LprG y LprA). El Ag85B es una proteína altamente estudiada como potencial candidata para el desarrollo de vacunas antituberculosas prometedoras.<sup>228</sup> Induce respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares (respuestas de las células T CD4 y CD8) en pacientes infectados por MTB.<sup>106,107</sup> Además, algunos estudios ya han demostrado el efecto inmunoprotector de Ag85B en modelos animales.<sup>229</sup> Las otras dos proteínas, LprG y LprA, son lipoproteínas que inhiben el procesamiento de antígenos por el complejo de histocompatibilidad II (MHC-II) en macrófagos y células dendríticas a través de un reconocimiento mediante receptores de tipo Toll (TLR2).<sup>84,86</sup> A su vez, existen estudios donde se corrobora el potencial inmunoprotector de las vesículas secretadas por parte de la bacteria, que contienen principalmente estas dos proteínas seleccionadas, cuando se aplican en modo preventivo.<sup>79</sup>

#### IV.2.b.1. Evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad y la capacidad de activación del sistema inmune de los nanosistemas

En primer lugar, se lleva a cabo un estudio de la viabilidad de una línea celular de macrófagos de ratón expuestos a diferentes concentraciones (5, 10 y 50  $\mu\text{g/mL}$ ) de los nanosistemas (**MSNs**, **MSNs-Ag85B**, **MSNs-LprG** y **MSNs-LprA**) durante 24 y 48 h. Los resultados obtenidos (Figura IV.8) demuestran que, en todos los casos, la viabilidad no se ve reducida por debajo del 50%, pero si se observan cambios en la misma cuando las células son expuestas a los materiales con las proteínas inmunomoduladoras con respecto a las células expuestas con el material sin funcionalizar (**MSNs**). Estas variaciones son dependientes de la concentración del material, así como del tiempo de exposición.



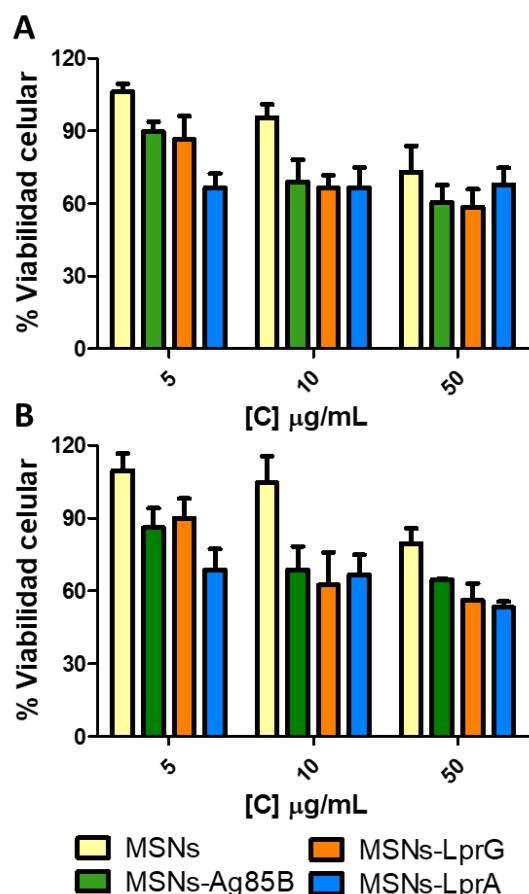


Figura IV.8. Viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7 expuestos a diferentes concentraciones (5, 10 y 50 µg/mL) de los materiales **MSNs**, **MSNs-Ag85B**, **MSNs-LprG** y **MSNs-LprA** durante 24 (A) y 48 (B) h.

En base a los resultados obtenidos, con el fin de seleccionar la dosis de nanomaterial que llegue a mostrar efectos de activación del sistema inmune, pero mantenga la biocompatibilidad con el sistema *in vitro*, los siguientes estudios se centran en dosis de 10 µg/mL durante 24 h.

La activación del sistema inmune está asociada con la liberación de citoquinas por parte de las células. Estas citoquinas son moléculas que median la comunicación intracelular en el sistema inmune, siendo producidas por diversas células. En tuberculosis se puede asociar una participación efectiva de diversas citoquinas, tales como las interleuquinas, entre las que se encuentran interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-12, IL-23, IL-17 e IL-10.<sup>230</sup> Por ello, para evaluar la capacidad estimuladora de los materiales se seleccionaron dos citoquinas representativas como TNF- $\alpha$  e IL-10. Antes de la cuantificación, las células RAW 264.7 son expuestas a 10 µg/mL de los nanosistemas durante 24 h. El estudio se realiza en condiciones normales de crecimiento, así como en ausencia de suero para evaluar si las posibles interacciones o adsorción inespecífica de las proteínas del suero sobre la superficie de los nanomateriales dan lugar a una variación en la secreción de las citoquinas estudiadas.

TNF- $\alpha$  es una citoquina pro-inflamatoria que ejerce múltiples efectos biológicos. Esta citoquina actúa en sinergia con el IFN- $\gamma$ , estimulando la producción de intermediarios reactivos del nitrógeno (RNIs), mediando así la función de los macrófagos contra la tuberculosis. TNF- $\alpha$  también estimula la migración de las células inmunitarias al lugar de la infección, contribuyendo a la formación del granuloma, capaz de controlar la progresión de la enfermedad.<sup>230,231</sup> El bloqueo de la citoquina TNF- $\alpha$  tiene efectos dramáticos en la progresión de tuberculosis, tal y como se ha demostrado en modelos *in vivo*.<sup>230</sup> Los resultados obtenidos demuestran que los nanosistemas desarrollados provocan una activación del sistema inmune, confirmada por la secreción significativa de la citoquina TNF- $\alpha$  en los cultivos tratados frente a los control (Figura IV.9). El aumento observado en la liberación de TNF- $\alpha$ , también es significativo con respecto a los cultivos expuestos a los materiales sin proteínas inmunomoduladoras (**MSNs**) por lo que confirma el efecto de las proteínas inmunomoduladoras. Además, ese efecto es similar al que se puede obtener cuando las células son tratadas con lipopolisacáridos, como control positivo en la liberación de la citoquina de estudio.

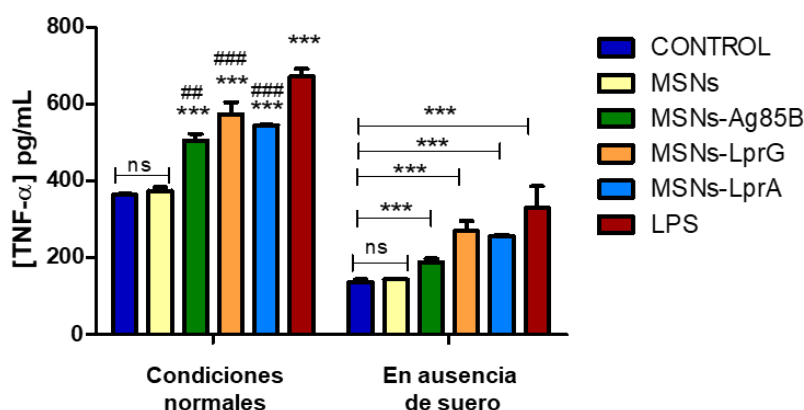


Figura IV.9. Niveles de TNF- $\alpha$  secretado por macrófagos RAW 264.7 tras la exposición a 10  $\mu$ g/mL de **MSNs**, **MSNs-Ag85B**, **MSNs-LprG** y **MSNs-LprA** durante 24 h. Células tratadas con LPS (100 ng/mL) son empleadas como control positivo. Los datos son evaluados mediante ANOVA y posterior test de Bonferroni. \*\*\* $p < 0.001$  frente al control; ## $p < 0.005$  y ### $p < 0.001$  frente a las células tratadas con **MSNs**; ns, no significativo.

Por otro lado, la IL-10 es una citoquina que actúa inhibiendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la acción de las células presentadoras de antígenos. Además, puede inhibir la fagocitosis y la muerte microbiana al limitar la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno en respuesta al IFN- $\gamma$ . Teniendo estos hechos en cuenta, esta citoquina es considerada como anti-inflamatoria. Sin embargo, esta citoquina juega un papel importante como un efector del balance entre la supresión y activación de las respuestas frente a

patógenos. En concreto, en tuberculosis es bien sabido que generalmente en los pacientes con esta enfermedad se encuentran niveles elevados de IL-10 y se puede relacionar con una mayor incidencia de la patología. Por el contrario, la presencia de altos niveles de esta citoquina en pacientes sanos expuestos al contacto con pacientes enfermos, sugiere que la IL-10 está involucrada en la respuesta natural frente a la excesiva respuesta pro-inflamatoria generada por la TNF- $\alpha$ .<sup>232</sup> Por ello, la presencia simultánea de las dos citoquinas, IL-10 y TNF- $\alpha$  en una etapa previa a la exposición a la bacteria puede suponer un beneficio para los individuos, al obtener un balance en las respuestas del sistema inmune.<sup>233</sup> Según estas premisas, y de acuerdo a la importancia de esta citoquina en el desarrollo de terapias y vacunas,<sup>234</sup> se evalúa la liberación de la misma tras la exposición a los materiales desarrollados. Los resultados obtenidos demuestran niveles superiores de dicha citoquina tras el tratamiento con los materiales que presentan las proteínas inmunomoduladoras frente a los cultivos control, así como a los tratados con el material sin funcionalizar (MSNs) (Figura IV.10).

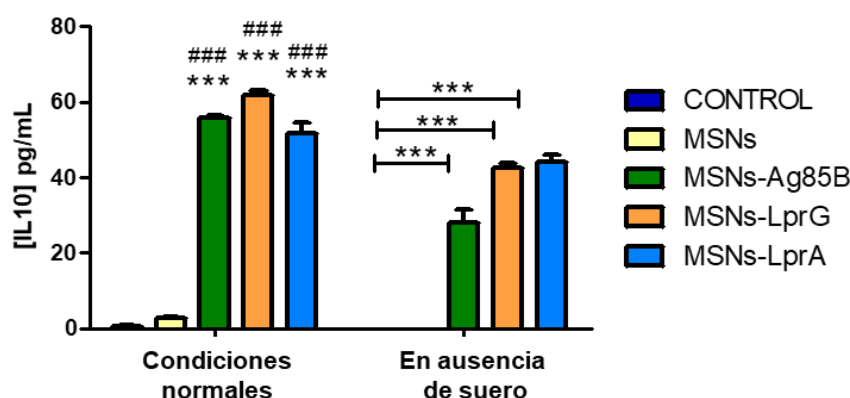


Figura IV.10. Niveles de IL-10 secretado por macrófagos RAW 264.7 tras la exposición a 10  $\mu\text{g/mL}$  de MSNs, MSNs-Ag85B, MSNs-LprG y MSNs-LprA durante 24 h. Los datos son evaluados mediante ANOVA y posterior test de Bonferroni. \*\*\* $p < 0.001$  frente al control; ###  $p < 0.001$  frente a las células tratadas con MSNs.

No obstante, se observa que mientras que los macrófagos secretan TNF- $\alpha$  en ausencia de estímulo, la liberación de IL-10 solo sucede en presencia de los materiales funcionalizados. De la misma manera, durante el periodo de estimulación con dichos materiales los macrófagos liberan hasta 10 veces más TNF- $\alpha$  que IL-10. Para ambas citoquinas se observa una disminución en la capacidad de producción cuando los macrófagos se cultivan en ausencia de suero, relativos a la condición con suero. Esto puede explicarse por una reducción en la velocidad de crecimiento celular del cultivo, debido a la ausencia de ciertos factores de crecimiento presentes en el suero y a un incremento del estrés por la falta de nutrientes.

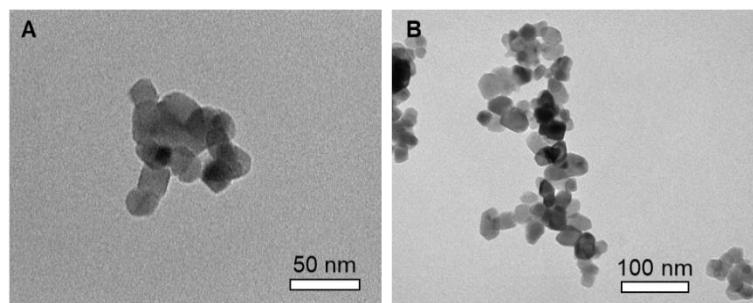
*IV.2.c. Estudio de los efectos citotóxicos de las TiO<sub>2</sub>-NPs sobre queratinocitos humanos*

El amplio uso de las **TiO<sub>2</sub>-NPs** en productos de consumo, así como sus crecientes aplicaciones biomédicas, supone un aumento de la exposición de los seres humanos a dichas nanopartículas. Por ello, es de gran interés el estudio y conocimiento de su potencial citotóxico. En la presente Tesis el estudio se centra en la evaluación de los efectos tóxicos en células epiteliales con el fin de conocer en mayor detalle la acción de estas NPs sobre esta barrera natural a agentes externos.

*IV.2.c.1. Caracterización de las TiO<sub>2</sub>-NPs comerciales*

Las nanopartículas comerciales de TiO<sub>2</sub> son caracterizadas para conocer en mayor detalle el tamaño y la forma de las mismas, así como parámetros importantes para la realización de los ensayos sucesivos, como el tamaño hidrodinámico y el potencial  $\zeta$ , que nos darán una idea del comportamiento de las partículas en suspensión.

Tal y como muestra la Figura IV.11, las **TiO<sub>2</sub>-NPs** en fase de anatasa presentan una tendencia a la esfericidad aunque se observan variaciones entre partículas, las cuales dentro de esa forma muestran caras planas definidas con tendencia a una forma poliédrica.



*Figura IV.11. Imágenes de TEM de las TiO<sub>2</sub>-NPs en forma anatasa a 200 (A) y 1000 mg/L(B).*

Por otro lado, las **TiO<sub>2</sub>-NPs** en fase rutilo (Figura IV.12) muestran una forma poliédrica alargada. En ambas fases, los tamaños observados son inferiores a 50 nm, tal y como se esperaba de las especificaciones comerciales. A su vez, ambas formas cristalinas presentan una tendencia a la agregación dependiente de la concentración de las nanopartículas.

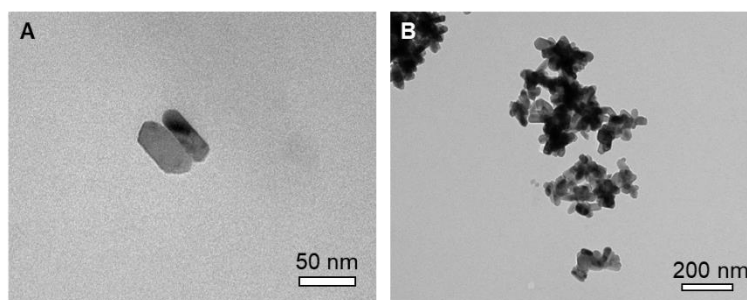


Figura IV.12. Imágenes de TEM de las **TiO<sub>2</sub>-NPs** en forma rutilo a 200 (A) y 1000 mg/L(B).

Las medidas de DLS muestran los tamaños hidrodinámicos de las partículas en suspensión. Ambas fases presentan valores similares, tal y como se observa en la Tabla IV-3, aunque el tamaño hidrodinámico de la fase anatasa es inferior que en el caso del rutilo, como cabe esperar por el menor tamaño de partícula observado por TEM. El potencial  $\zeta$  en el caso de la fase anatasa muestra un valor dentro de la zona de inestabilidad coloidal<sup>209</sup> por lo que, junto con el valor de índice de polidispersidad ( $PDI = 0.74$ ), corroboran la tendencia a la agregación y la inestabilidad en suspensión dando lugar también a ese elevado tamaño hidrodinámico en comparación con el tamaño determinado por TEM ( $< 50$  nm). Sin embargo, el rutilo muestra un valor de potencial  $\zeta$  que da idea de la mayor estabilidad, lo cual se confirma por el valor de  $PDI$  ( $0.23$ ) dando idea de la menor tendencia a la agregación en comparación con la fase anatasa.

Tabla IV-3. Valores de potencial  $\zeta$  y tamaño hidrodinámico de partícula en agua de las **TiO<sub>2</sub>-NPs**.

Material	Potencial $\zeta$ (mV)	Tamaño hidrodinámico <sup>a</sup>
<b>TiO<sub>2</sub>-NPs (anatasa)</b>	$7 \pm 3$	$132 \pm 10$
<b>TiO<sub>2</sub>-NPs (rutilo)</b>	$-23 \pm 4$	$160 \pm 9$

<sup>a</sup> Los datos corresponden con el máximo de la distribución de tamaños medida por DLS.

Estas caracterizaciones nos aportan información relevante para la preparación de las suspensiones de las **TiO<sub>2</sub>-NPs**, ya que se requiere del empleo de ultrasonidos para la correcta dispersión y conseguir el menor índice de polidispersidad y con ello la menor agregación.

#### IV.2.c.2. Viabilidad celular tras la exposición a las NPs

Para iniciar el estudio del potencial citotóxico de cualquier nanomaterial se lleva a cabo en primer lugar un análisis de la viabilidad celular tras la exposición a distintas concentraciones del mismo.

En este caso, inicialmente se evalúa la exposición de las células HaCaT a tres tiempos (24, 48 y 72 h) y 3 concentraciones (0.1, 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$ ) de **TiO<sub>2</sub>-NPs**, anatasa y rutilo, mediante el ensayo MTT. Los resultados de este estudio muestran valores de viabilidad celular por encima del 100% en el caso de los cultivos tratados con respecto al cultivo control. Este hecho se explica por la interferencia que supone la presencia de estas nanopartículas a la longitud de onda de medida; por lo que se requiere de un método alternativo para el estudio de la viabilidad celular.

La primera alternativa estudiada se basa en el empleo del método de exclusión de colorantes, como es el caso del azul de tripano. Así, se evalúan dos concentraciones (10 y 30  $\mu\text{g/mL}$ ) de **TiO<sub>2</sub>-NPs**, en ambas formas anatasa y rutilo, pero centrándose en un tiempo de exposición largo, 72 h. Los resultados muestran una disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración y, a su vez, se puede observar como la fase anatasa presenta mayor toxicidad que la fase rutilo (Figura IV.13).

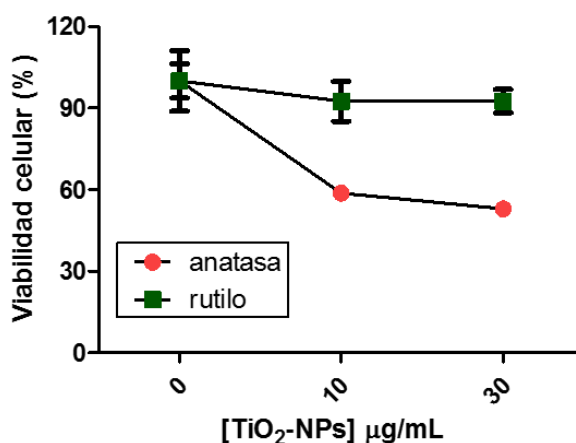


Figura IV.13. Viabilidad celular tras la exposición a diferentes concentraciones de las **TiO<sub>2</sub>-NPs** (10 y 30  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 72 h obtenida mediante el ensayo con azul de tripano.

En este caso la relación de la viabilidad se obtiene por la determinación de células viables y no viables, en función de la tinción, de tal manera que no intervienen en ningún caso las NPs presentes en el estudio. Por ello, los resultados en este caso presentan valores por debajo del 100% con respecto al control, confirmando que este método es válido para la evaluación de los efectos citotóxicos de estas NPs sobre la viabilidad celular.

En base a estos resultados y con el fin de proponer otro ensayo alternativo, basado en la reducción de la actividad metabólica, se lleva a cabo un estudio sobre una posible modificación del ensayo MTT tradicional. Tal y como se ha comentado anteriormente en la sección de metodología, la modificación realizada a este ensayo se basa en la introducción de

una etapa adicional de centrifugación para llevar a cabo las medidas de absorbancia en ausencia de las **TiO<sub>2</sub>-NPs** y evitar así las interferencias. Los resultados obtenidos en este caso demuestran que esta etapa adicional permite obtener resultados satisfactorios. La reducción de la viabilidad observada es semejante a la obtenida mediante el ensayo con el azul de tripano, ofreciendo por ello, una excelente alternativa al mismo. La Figura IV.14 muestra una comparación de los resultados obtenidos mediante los tres métodos empleados, observándose cómo en el caso del ensayo MTT tradicional, existe un aumento de la viabilidad celular en el caso de los cultivos tratados a diferencia de lo observado en el caso del ensayo MTT modificado y en el ensayo con azul de tripano.

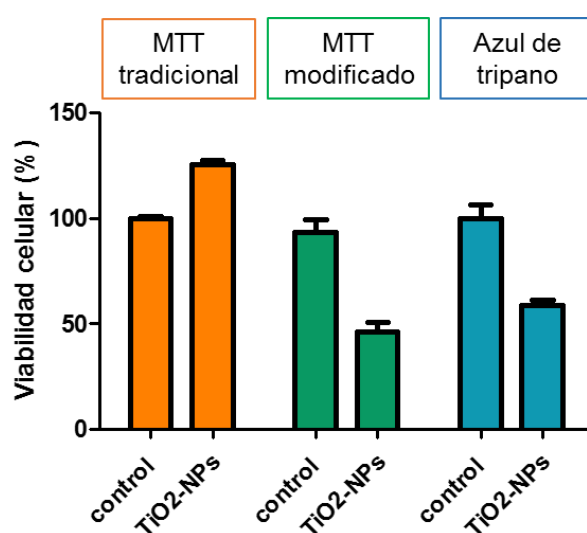


Figura IV.14. Comparación de la viabilidad celular obtenida para células control y células tratadas con 10  $\mu\text{g/mL}$  de **TiO<sub>2</sub>-NPs** mediante diferentes métodos: ensayo MTT tradicional, ensayo MTT modificado con centrifugación y ensayo con azul de tripano.

Teniendo en cuenta este ensayo como alternativa óptima, y en base a los resultados obtenidos con el ensayo de exclusión de colorantes, se evalúa la viabilidad celular a concentraciones crecientes (1, 10, 30 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) de la fase más tóxica (anatasa) a 72 h. Los resultados obtenidos (Figura IV.15) muestran una reducción de la viabilidad dependiente de la concentración, tal y como se había observado en experimentos previos.

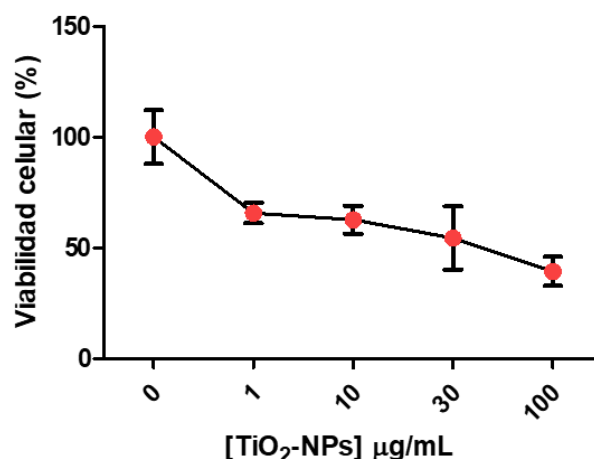


Figura IV.15. Viabilidad celular tras la exposición a diferentes concentraciones de las  $\text{TiO}_2\text{-NPs}$  (1, 10, 30 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 72 h obtenida mediante el ensayo MTT modificado con una etapa de centrifugación.

Estas variaciones observadas en la viabilidad celular, que se deben a la exposición a las NPs, confirman el potencial citotóxico de las mismas y suponen la base para profundizar en sus efectos asociados, así como en los mecanismos moleculares afectados. Con este propósito, para los sucesivos ensayos se debe seleccionar la concentración de NPs de estudio, la cual debe ser lo suficientemente baja como para evitar una reducción excesiva de la viabilidad, pero lo suficientemente elevada como para inducir cambios apreciables. Por ello, en la presente Tesis, se selecciona la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{TiO}_2\text{-NPs}$  para los estudios posteriores.

#### IV.2.c.3. Evaluación de los cambios morfológicos tras la exposición a las NPs y localización intracelular de las mismas

Asociada a la reducción de la viabilidad se pueden observar cambios morfológicos de las células tras la exposición a las  $\text{TiO}_2\text{-NPs}$ . Las imágenes obtenidas mediante microscopia de contraste de fases (Figura IV.16) muestran mayor vacuolización y deterioro celular cuando se comparan los cultivos tratados con los cultivos control. Estos cambios son dependientes del tiempo de exposición a las NPs.



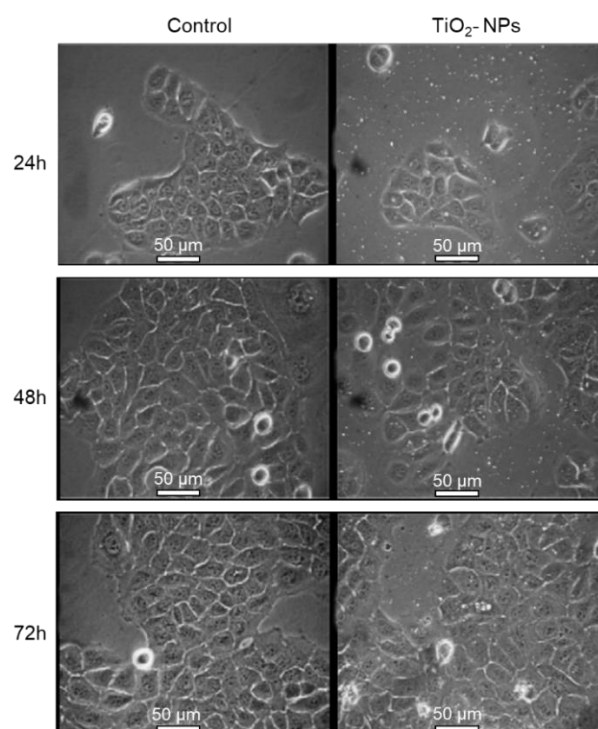


Figura IV.16. Cambios morfológicos producidos por la exposición a **TiO<sub>2</sub>-NPs** (10 µg/mL).

Estos resultados y cambios observados se confirman mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM). Gracias a esta técnica, además de observar en mayor detalle los efectos que producen las NPs a nivel morfológico, se puede conocer la localización de las mismas. La Figura IV.17 muestra la comparación entre las células control (Figura IV.17 A) y las células tratadas (Figura IV.17 B). Como se puede observar, las células tratadas presentan grandes agregados de nanopartículas en el interior de vacuolas, demostrando la internalización y localización de las mismas en el citoplasma.

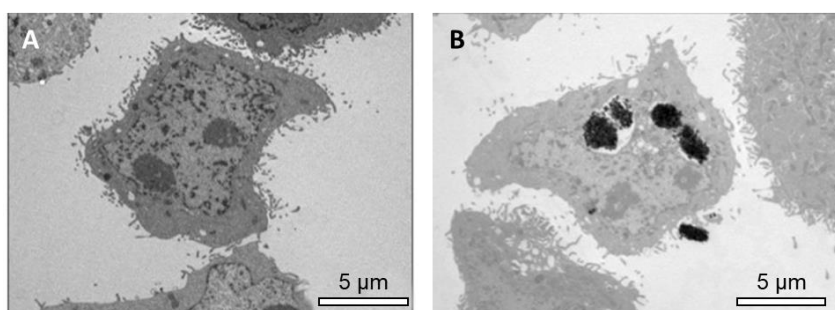


Figura IV.17. Imágenes de TEM de secciones ultrafinas de células HaCaT control (A) y células tratadas con 10 µg/mL **TiO<sub>2</sub>-NPs** (B).

Además, este estudio permite observar cómo los grandes agregados son internalizados mediante la formación de invaginaciones en la membrana celular (Figura IV.18 A). Además, debido al tamaño de los agregados, éstos solo se localizan en el interior de las vacuolas (Figura IV.18 C) sin llegar a atravesar la membrana nuclear (Figura IV.18 B). El análisis estadístico del número de vacuolas en los cultivos tratados y los cultivos control permite observar un aumento significativo del grado de vacuolización en las células tratadas con las NPs (Figura IV.18 D).

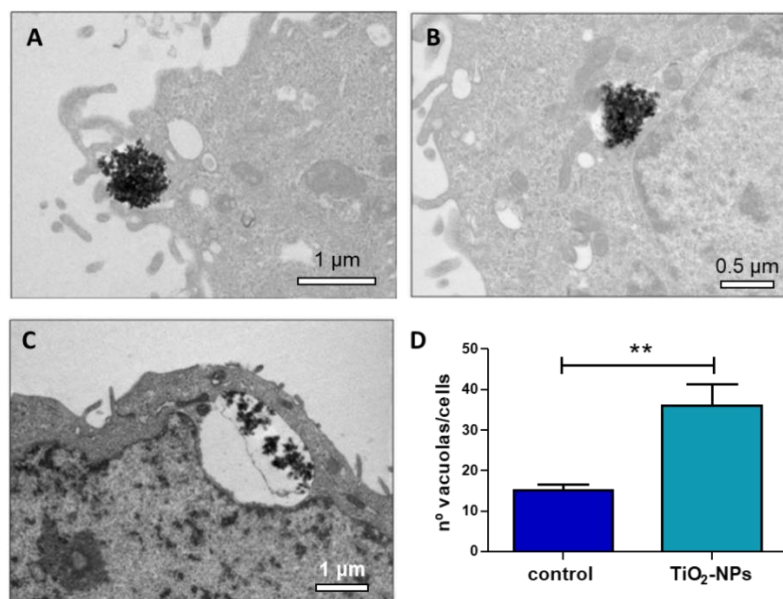


Figura IV.18. Imágenes de TEM de secciones ultrafinas de células HaCaT tratadas con **TiO<sub>2</sub>-NPs** (10 µg/mL) (A-C). Grado de vacuolización en células tratadas y control (D).

#### IV.2.c.4. Estudio del grado de apoptosis y del perfil del ciclo celular tras la exposición a las NPs

Con el fin de profundizar en el estudio de la reducción de la viabilidad debida a las NPs, se analizan mediante citometría de flujo las diferentes poblaciones celulares: células viables, apoptóticas y necróticas o en fases finales de apoptosis. Para ello se emplean la anexina-V marcada con FITC y el yoduro de propidio (IP). Los resultados demuestran que las poblaciones de células viables, las cuales no presentan marcaje de ningún tipo, así como las apoptóticas o apoptóticas tardías, marcadas únicamente con anexina o con ambos marcajes, anexina y IP, respectivamente, son similares al comparar entre las células expuestas a NPs y las células control (Figura IV.19). Ambos conjuntos celulares muestran un perfil de citometría similar y por ello no existen diferencias significativas que concluyan en un incremento de muerte celular por apoptosis, inducida por la exposición a **TiO<sub>2</sub>-NPs**.

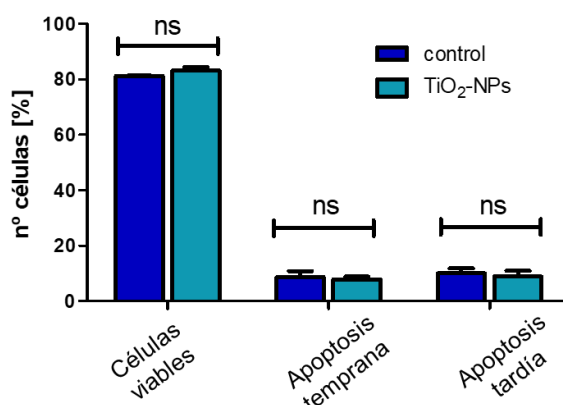


Figura IV.19. Evaluación del grado de apoptosis de las células HaCaT tras la exposición a 10  $\mu\text{g/mL}$  de TiO<sub>2</sub>-NPs obtenido mediante citometría de flujo con anexina-V marcada con FITC y yoduro de propidio. Los datos son analizados mediante un test ANOVA seguido de un test multiple de Bonferroni. ns: sin diferencias significativas

Teniendo en cuenta que los efectos de las NPs no se relacionan con un incremento de la muerte celular, se procede a evaluar el perfil del ciclo celular con el fin de identificar el mecanismo por el que se produce la reducción de la viabilidad celular observada. Mediante citometría de flujo y empleando un agente intercalante de ADN, el reactivo Hoescht, se lleva a cabo una cuantificación del contenido de ADN en las poblaciones celulares control y las tratadas con las TiO<sub>2</sub>-NPs, con objeto de identificar las subpoblaciones de células existentes en las diferentes fases del ciclo celular. Los resultados obtenidos (Figura IV.20) demuestran que existen diferencias significativas al comparar ambas condiciones. Como puede observarse en los cultivos tratados hay una disminución de la cantidad de células en fase G0/G1 y un aumento en la fase S-G2/M, en comparación con los cultivos control. Estos resultados indican una parada o arresto del ciclo celular en dicho punto.

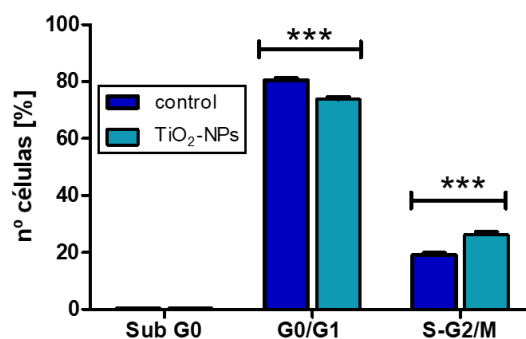


Figura IV.20. Evaluación del perfil del ciclo celular de las células HaCaT tras la exposición a 10  $\mu\text{g/mL}$  de TiO<sub>2</sub>-NPs obtenido mediante citometría de flujo con Hoescht. Los datos son analizados mediante un test ANOVA seguido de un test multiple de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0.001$  frente al control.

#### IV.2.c.5. Análisis de expresión génica y proteica de moléculas claves en la regulación del ciclo celular

De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio del perfil del ciclo celular, donde se observa un arresto del mismo debido al efecto de las **TiO<sub>2</sub>-NPs**, que explicaría la reducción en la viabilidad celular tras la exposición a las mismas, se establece un estudio detallado de ciertas proteínas importantes en la regulación del ciclo celular.

La Figura IV.21 muestra las distintas fases de dicho ciclo, así como los puntos de control y las moléculas clave que están implicadas en cada uno de ellos. Principalmente, se pueden destacar dos tipos de moléculas, las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks), que determinan la progresión de una célula a través del ciclo celular. Cuando las Cdks son activadas por unión a una ciclina, se lleva a cabo una reacción bioquímica llamada fosforilación que activa o inactiva las proteínas diana para dirigir la entrada coordinada en la siguiente fase del ciclo celular.<sup>235-237</sup> Existen diferentes combinaciones ciclina-Cdk, las cuales determinan las proteínas diana sobre las cuales actúan. Las Cdks se expresan constitutivamente en las células, mientras que las ciclinas se sintetizan en etapas específicas del ciclo celular en respuesta a diversas señales moleculares.<sup>238,239</sup>

Dentro del ciclo celular se pueden encontrar puntos de control que permiten a la célula supervisar y regular el progreso del ciclo celular.<sup>236,237,240</sup> Estos puntos de control previenen la progresión del ciclo celular en puntos específicos, permitiendo la verificación de los procesos de fase necesarios y la reparación del daño del ADN. Así, la célula no puede pasar a la fase siguiente hasta que se hayan cumplido los requisitos de los puntos de control, lo que supone asegurar que el ADN dañado o incompleto no se transmita a las células hijas. Existen dos puntos de control principales: el punto de control G1/S y el punto de control G2/M. La transición G1/S es un paso que limita la velocidad en el ciclo celular y también se conoce como punto de restricción. En éste, participa la Ciclina E que al unirse con Cdk2, formando el complejo Ciclina E-Cdk2, permite que la célula pase de la fase G1 a la fase S.

La Ciclina B junto con la Cdk1, formando el complejo Ciclina B-Cdk1, participa en el segundo punto de control que inicia la transición de la fase G2 a la M. La activación del complejo Ciclina B-Cdk1 origina la ruptura de la envoltura nuclear y el inicio de la profase. Posteriormente, la desactivación de este complejo hace que la célula salga de la mitosis. Para que este complejo se active, el ADN celular debe estar completamente replicado y sin daños. En caso contrario, la célula no entra en la fase mitótica.

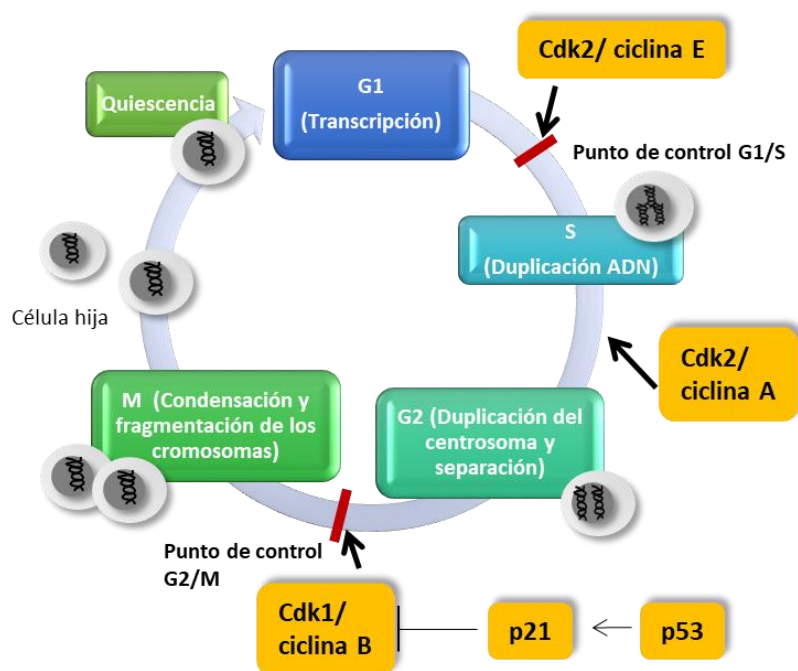


Figura IV.21. Esquema del ciclo celular y algunas de las proteínas implicadas en su regulación.

Por otro lado, en la Figura IV.21 también se muestran otras moléculas implicadas en la progresión del ciclo celular como p53, un factor de transcripción específico de secuencia<sup>240</sup> y el inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (CKI) denominado p21<sup>241</sup>. El factor de transcripción p53 se une al ADN de forma específica y regula la transcripción de productos génicos implicados en la parada del crecimiento celular, la reparación del ADN, la apoptosis y la inhibición de la angiogénesis. La parada del crecimiento celular mediada por p53 proviene de la transactivación de p21, 14-3-3σ, y GADD45, entre otros. Además, el inhibidor p21, junto con otros genes, también posee un papel relevante en las vías de reparación del ADN mediante el aumento de su regulación transcripcional por parte de p53.

Debido al aumento de la población celular en la fase S/G2-M cuando las células son expuestas a las nanopartículas, se ha llevado a cabo un estudio de expresión génica de los puntos de control y los mecanismos implicados en estas fases. Los resultados de los niveles de ARNm de cada componente se muestran en la Figura IV.22. La cuantificación que se muestra en este caso es de tipo relativo, donde se describen los cambios de expresión de un determinado gen en la muestra tratada con **TiO<sub>2</sub>-NPs**, frente a una muestra control, sin tratar. El método empleado viene definido por la siguiente ecuación:<sup>242</sup>

$$\text{Cantidad relativa del gen (u. a)} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

En donde se requiere la definición de un gen que se emplea como control interno, el cual no sufre cambios de expresión tras la exposición a las **TiO<sub>2</sub>-NPs** y una muestra que se

emplea como calibrante, frente a la cual se realizan las cuantificaciones relativas que, en este caso, tal y como se ha comentado anteriormente, se trata de una muestra control sin tratar. El gen empleado como control interno es el GADPH, definiéndose así el factor  $\Delta\Delta C_T$  como:

$$\begin{aligned}\Delta\Delta C_T &= \Delta C_{T,TiO_2NPs} - \Delta C_{T,control} \\ \Delta C_{T,TiO_2NPs} &= (C_{T,gen\ de\ interés} - C_{T,GADPH})_{TiO_2NPs} \\ \Delta C_{T,control} &= (C_{T,gen\ de\ interés} - C_{T,GADPH})_{Control}\end{aligned}$$

Para que la aplicación de este método sea válida se requiere que la eficacia de la amplificación del gen de interés y del de referencia sea aproximadamente igual. Por ello, es importante destacar que el uso de sondas TaqMan, en lugar de cebadores convencionales para la detección con SYBER Green, supone una ventaja ya que éstas presentan una eficacia cercana a 1 en todos los casos.<sup>242,243</sup>

De acuerdo con este método, si nos centramos en los resultados obtenidos para los componentes del punto de control G1/S, se observa una reducción de los niveles de ARNm de Cdk2 (CDK2) pero no se observan cambios relevantes en los niveles de ARNm de la Ciclina E1 (CCNE1). Durante la síntesis de ADN, dentro de la fase S del ciclo celular, otro complejo de Cdk2 con Ciclina A1 (CCNA1) es el responsable del control del transcurso de esa fase a la siguiente. Los análisis obtenidos para los componentes de este otro complejo muestran una reducción en los niveles de ambos genes en comparación con las células control. Además, se evalúan los componentes del punto de control G2/M, en donde se observa que la exposición de las células a las **TiO<sub>2</sub>-NPs** provoca una disminución de los niveles de Ciclina B1 (CCNB1) y de Cdk1 (CDK1).

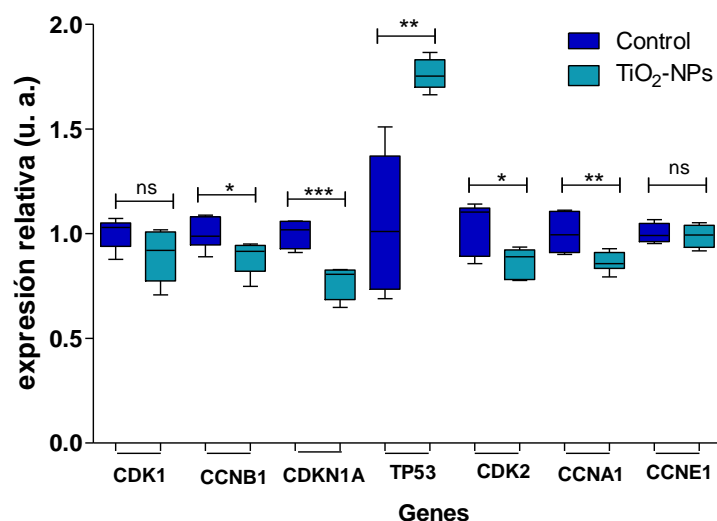


Figura IV.22. Niveles de ARN<sub>m</sub> de los diferentes genes implicados en la regulación del ciclo celular: CDK1, CCNB1, CDKN1A, TP53, CDK2, CCNA1 y CCNE1. Significación estadística al comparar con el control: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$

Además, los resultados de niveles de ARN<sub>m</sub> para las otras dos proteínas importantes en la regulación del ciclo celular muestran un aumento en los niveles de p53 en los cultivos tratados y, sin embargo, una disminución en los niveles de p21, un inhibidor de la CDK dependiente de p53 que debería estar aumentado en base a nuestros resultados anteriores.

Con el fin de confirmar esa reducción de los niveles de p21 se lleva a cabo un estudio de expresión proteica mediante el ensayo Western blot. Para ello, se trataron las células con las **TiO<sub>2</sub>-NPs** y posteriormente el lisado celular, que contiene la totalidad de las proteínas, fue separado electroforéticamente y transferido a una membrana para la realización del inmunoensayo empleando anticuerpos específicos para el inhibidor de quinasas dependiente de Ciclina p21. Los resultados muestran una inhibición parcial de p21 cuando se comparan los cultivos tratados con los cultivos control (Figura IV.23).

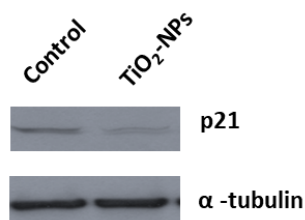


Figura IV.23. Análisis de los niveles expresión del inhibidor de quinasas dependiente de Ciclina p21 tras la exposición celular a **TiO<sub>2</sub>-NPs**.



## IV.2.c.6. Estudio de expresión diferencial de proteínas tras la exposición a las nanopartículas

La alteración sobre las fases del ciclo celular, que se han descrito anteriormente, así como las desregulaciones sobre los componentes que lo controlan, no son los únicos efectos de estas partículas sobre las células, ya que, tal y como se muestra en la bibliografía, las **TiO<sub>2</sub>-NPs** originan respuestas inflamatorias que dan lugar a un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS).<sup>160,244,245</sup> El origen de las ROS se encuentra en la fotoactivación de las NPs, e incluso, como consecuencia de la interacción de éstas con componentes celulares. De esta forma, estas NPs generan estrés oxidativo y desencadenan genotoxicidad. A concentraciones bajas se ha observado una disminución de los niveles de enzimas antioxidantes. Por otro lado, la modificación de bases, la ruptura simple o doble de la hebra del ADN y las uniones directas del TiO<sub>2</sub> a las enzimas de reparación o al ADN se pueden observar en distintos modelos tratados con concentraciones elevadas de dichas NPs.<sup>160</sup>

En base a esto, en la presente Tesis Doctoral se decide profundizar en los mecanismos moleculares que se encuentran afectados por estas NPs. Para ello, se lleva a cabo un estudio de expresión diferencial de proteínas, empleando la estrategia denominada SILAC (Figura IV.24 A). Los resultados de este ensayo permiten identificar un total de 1874 proteínas mediante espectrometría de masas con al menos un péptido único y una tasa de falsos positivos del 0.83%.

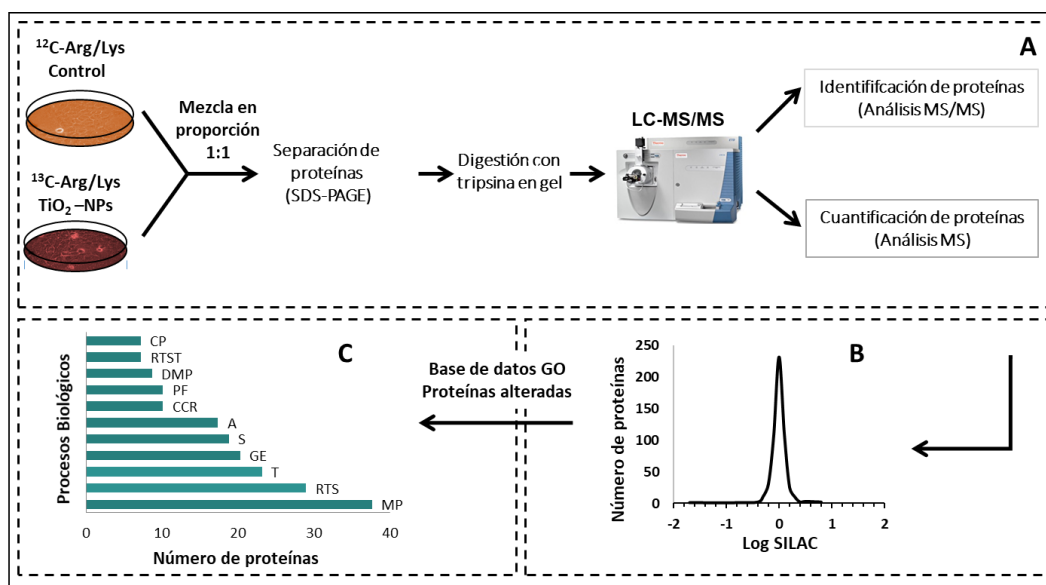


Figura IV.24. Esquema general del procedimiento SILAC (A). Distribución de los cocientes SILAC para las proteínas cuantificadas (B). Agrupación funcional de las 69 proteínas alteradas por la exposición a **TiO<sub>2</sub>-NPs** obtenida a través de la base de datos "Gene Ontology GO" (C). Entre los principales procesos moleculares y biológicos alterados se incluyen los procesos metabólicos (MP), la respuesta al estímulo (RTS), el transporte (T), la expresión génica (GE), la señalización (S), la apoptosis (A), la regulación del ciclo celular (CCR), el plegamiento de proteínas (PF), los procesos metabólicos del ADN (DMP), la respuesta al estrés (RTST) y la proliferación celular (CP).



Una vez que se han identificado las proteínas mediante el motor de búsqueda MASCOT, se emplea el programa informático QuiXot para la cuantificación de las mismas usando los espectros de masas (Zoomscans). En este punto, se evalúan cada uno de los espectros obtenidos manualmente confirmando que se cumple la relación de masa entre los péptidos que provienen de cada una de las poblaciones, tal y como se muestra en la Figura IV.25.

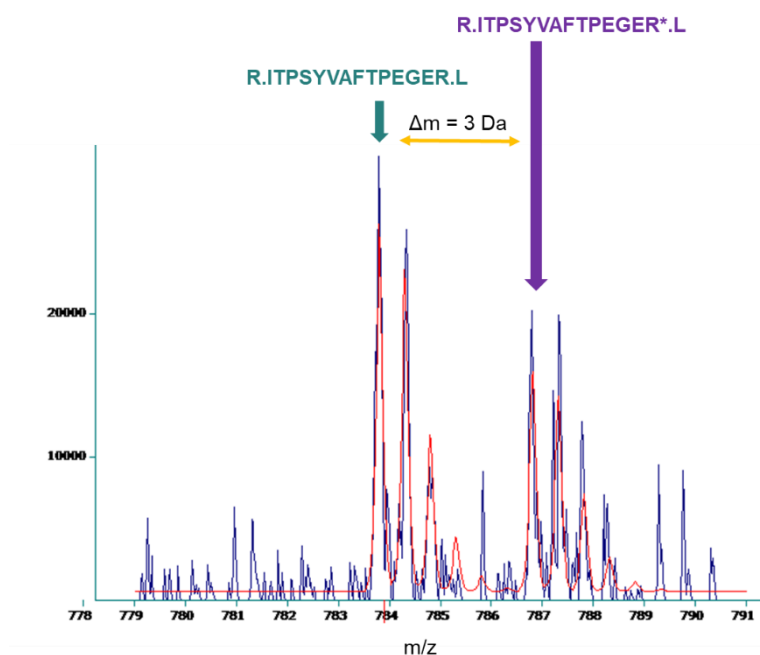


Figura IV.25. Ejemplo de un espectro de masas (Zoomscan) de un péptido marcado (población B) y sin marcar (población A) donde se observa una diferencia de masa de 3 Da, correspondiente a un péptido con carga +2 y un solo aminoácido marcado en su secuencia.

Del total de las proteínas identificadas, sólo 537 proteínas cumplen los criterios seleccionados para su cuantificación (al menos dos péptidos únicos). Posteriormente, el estudio se centra en la obtención del denominado cociente SILAC que nos da información acerca de la desregulación de la expresión de las proteínas. El cociente SILAC se define a través de la siguiente ecuación:

$$R_{SILAC} = \frac{I_{P1}/I_{L1} + I_{P2}/I_{L2} + \dots + I_{Pn}/I_{Ln}}{n}$$

Donde  $I_P$  es la intensidad del pico correspondiente al péptido “pesado” procedente de la población celular B,  $I_L$  la intensidad del pico correspondiente al péptido “ligero” procedente de la población celular A, y  $n$  el número de péptidos cuantificados para una proteína determinada.

En este estudio, el umbral de significación tomado para establecer la desregulación de proteínas se fija en cocientes SILAC por encima de +1.5, para proteínas consideradas sobreexpresadas, o en cocientes menores a -1.5, para proteínas que se consideran inhibidas. Además, cabe destacar que en todos los casos se establece un máximo del 20% de desviación estándar relativa (RSD) entre péptidos dentro de cada proteína para dar por válido el cociente SILAC obtenido. De acuerdo con estos criterios, 69 proteínas aparecen desreguladas después de la exposición a las **TiO<sub>2</sub>-NPs** en comparación con el cultivo control (Tabla IV-4). De éstas, 31 se encuentran sobreexpresadas y 38 inhibidas. Con respecto a la distribución de la proporción de cocientes SILAC, la mayoría de las proteínas identificadas presentan unos valores cercanos a 1, confirmando una mezcla correcta de las dos poblaciones celulares en proporción 1:1 (Figura IV.24 B).

Para estudiar en profundidad las funciones moleculares y celulares de las proteínas alteradas, se procede a la clasificación de las mismas empleando la base de datos de Gene Ontology (GO). Encontramos proteínas desreguladas involucradas en diferentes procesos biológicos como la regulación del ciclo celular, la expresión génica, los procesos metabólicos o la respuesta al estímulo, entre otros ( Figura IV.24 C).

*Tabla IV-4. Tabla de proteínas desreguladas obtenidas en la evaluación del potencial citotóxico de las TiO<sub>2</sub>-NPs.*

Número gi	Nombre proteína	Nombre común	R <sub>SILAC</sub>	RSD <sub>SILAC</sub>
4502027	serum albumin preproprotein [Homo sapiens]	ALB	-44,37	19,83
7706495	dnaJ homolog subfamily B member 11 precursor [Homo sapiens]	DNAJB11	-6,44	15,04
67782305	superoxide dismutase [Mn], mitochondrial isoform A precursor [Homo sapiens]	SOD2	-2,71	3,95
289577080	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 isoform 1 [Homo sapiens]	EIF4G2	-2,51	13,36
4759140	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 [Homo sapiens]	SLC9A3R1	-2,19	14,75
50592996	tubulin beta-3 chain isoform 1 [Homo sapiens]	TUBB3	-2,14	9,69
4506411	ran GTPase-activating protein 1 [Homo sapiens]	RANGAP1	-2,09	8,14
32454741	serpin H1 precursor [Homo sapiens]	SERPINH1	-2,00	18,72
77404397	staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 [Homo sapiens]	SND1	-1,93	17,14
7549809	plastin-3 isoform 1 [Homo sapiens]	PLS3	-1,93	19,02
16757970	protein Niban isoform 2 [Homo sapiens]	FAM129C	-1,91	19,89
19224660	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 3 [Homo sapiens]	PACSIN3	-1,85	1,64
119395750	keratin, type II cytoskeletal 1 [Homo sapiens]	KRT1	-1,82	17,79
4557237	acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	ACAT1	-1,79	19,94
4885281	glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	GLUD1	-1,78	17,49
4503481	elongation factor 1-gamma [Homo sapiens]	EEF1G	-1,77	10,75
62460637	importin-4 [Homo sapiens]	IPO4	-1,73	7,07
157694492	myb-binding protein 1A isoform 2 [Homo sapiens]	MYBBP1A	-1,72	14,09
21264616	epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2 [Homo sapiens]	EPS8L2	-1,70	4,13
51479156	ATP synthase subunit g, mitochondrial [Homo sapiens]	ATP5L	-1,69	10,34
21359945	condensin complex subunit 3 [Homo sapiens]	NCAPG	-1,68	4,50
4505029	leukotriene A-4 hydrolase isoform 1 [Homo sapiens]	LTA4H	-1,68	11,15
14141161	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U isoform b [Homo sapiens]	HNRNPU	-1,67	3,14
20357552	src substrate cortactin isoform a [Homo sapiens]	CTTN	-1,67	18,96
41322916	plectin isoform 1 [Homo sapiens]	PLEC	-1,66	17,96
5032093	neutral amino acid transporter B(0) isoform 1 [Homo sapiens]	SLC1A5	-1,66	18,63

<b>21361356</b>	mitochondrial import receptor subunit TOM34 [Homo sapiens]	TOMM34	-1,65	14,47
<b>67782365</b>	keratin, type II cytoskeletal 7 [Homo sapiens]	KRT7	-1,65	19,82
<b>4503143</b>	cathepsin D preproprotein [Homo sapiens]	CTSD	-1,63	19,08
<b>18104948</b>	60S ribosomal protein L21 [Homo sapiens]	RPL21	-1,62	9,38
<b>4504327</b>	trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	HADHB	-1,62	19,15
<b>4506675</b>	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 precursor [Homo sapiens]	RPN1	-1,62	16,04
<b>4503685</b>	farnesyl pyrophosphate synthase isoform a [Homo sapiens]	FDPS	-1,61	17,34
<b>11863154</b>	coatamer subunit delta isoform 1 [Homo sapiens]	ARCN1	-1,60	14,12
<b>194097350</b>	alpha-actinin-1 isoform a [Homo sapiens]	ACTN1	-1,57	17,69
<b>42734430</b>	polymerase I and transcript release factor [Homo sapiens]	PTRF	-1,54	18,26
<b>11559923</b>	eukaryotic translation initiation factor 4H isoform 1 [Homo sapiens]	EIF4H	-1,52	0,29
<b>4506715</b>	40S ribosomal protein S28 [Homo sapiens]	RPS28	1,50	6,80
<b>5729875</b>	membrane-associated progesterone receptor component 1 [Homo sapiens]	PGRMC2	1,51	0,002
<b>67089149</b>	protein PML isoform 1 [Homo sapiens]	PML	1,51	16,55
<b>38455427</b>	T-complex protein 1 subunit delta isoform a [Homo sapiens]	CCT4	1,51	14,33
<b>5174741</b>	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3 isoform 2 [Homo sapiens]	UCHL3	1,52	6,98
<b>4505595</b>	plasminogen activator inhibitor 2 [Homo sapiens]	SERPINB2	1,55	18,71
<b>5730023</b>	ruvB-like 2 [Homo sapiens]	RUUBL2	1,56	15,35
<b>4506629</b>	60S ribosomal protein L29 [Homo sapiens]	RPL29	1,57	18,28
<b>188497750</b>	hexokinase-1 isoform HKI-td [Homo sapiens]	HKDC1	1,59	4,13
<b>41872631</b>	fatty acid synthase [Homo sapiens]	FASN	1,61	11,17
<b>48255889</b>	glucosidase 2 subunit beta isoform 1 precursor [Homo sapiens]	PRKCSH	1,63	15,77
<b>4506667</b>	60S acidic ribosomal protein P0 [Homo sapiens]	RPLP0	1,64	16,23
<b>62240992</b>	cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic isoform c [Homo sapiens]	CARS	1,65	5,48
<b>4503729</b>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4 [Homo sapiens]	FKBP4	1,66	13,28
<b>5453998</b>	importin-7 [Homo sapiens]	IPO7	1,69	11,94
<b>388556516</b>	proteasome activator complex subunit 3 isoform 3 [Homo sapiens]	PSME3	1,79	18,56
<b>4506671</b>	60S acidic ribosomal protein P2 [Homo sapiens]	RPLP2	1,82	3,33
<b>6912238</b>	peroxiredoxin-5, mitochondrial isoform a precursor [Homo sapiens]	PRDX5	1,88	19,69
<b>4759300</b>	vesicle-associated membrane protein 3 [Homo sapiens]	VAMP3	1,95	5,42

<b>38016914</b>	SAM domain and HD domain-containing protein 1 [Homo sapiens]	SAMHD1	1,97	5,02
<b>188497754</b>	hexokinase-1 isoform HKI [Homo sapiens]	HK1	1,98	1,03
<b>47132587</b>	protein kinase C delta-binding protein [Homo sapiens]	PRKCDBP	2,03	19,79
<b>62241042</b>	bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase [Homo sapiens]	EPRS	2,05	12,84
<b>17999541</b>	vacuolar protein sorting-associated protein 35 [Homo sapiens]	VPS35	2,06	18,77
<b>4557395</b>	carbonic anhydrase 2 [Homo sapiens]	CA2	2,11	16,60
<b>7242140</b>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	CLPX	2,28	18,23
<b>15451856</b>	caveolin-1 isoform alpha [Homo sapiens]	CAV1	2,64	17,77
<b>29826282</b>	protein phosphatase 1G [Homo sapiens]	PPM1G	2,90	3,87
<b>118601081</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 [Homo sapiens]	HNRNPUL2	3,21	8,89
<b>195972866</b>	keratin, type I cytoskeletal 10 [Homo sapiens]	KRT10	3,51	11,33
<b>6005757</b>	FACT complex subunit SPT16 [Homo sapiens]	SUPT16H	5,70	9,62
<b>47132620</b>	keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal [Homo sapiens]	KRT2	6,63	16,37

El primer paso para entender la toxicidad de las nanopartículas es el estudio de la internalización de las mismas en las células. Se han descrito numerosas rutas por las cuales las células pueden internalizar dichos materiales entre las que se encuentran la endocitosis mediada por clatrina, la mediada por caveolas o los mecanismos de endocitosis independientes de ambas.<sup>246</sup> En este estudio proteómico se muestran desreguladas varias proteínas involucradas en procesos dependientes de caveolas, CAV-1 ( $R_{\text{SILAC}} = 2.64$ ) y mediados por clatrina, CTTN ( $R_{\text{SILAC}} = -1.67$ ) o en la formación de vesículas como PACSIN3 ( $R_{\text{SILAC}} = -1.85$ ).

La endocitosis dependiente de caveolas o también conocida como dependiente de “lipid rafts” consiste en la formación de invaginaciones en la membrana plasmática, denominadas caveolas, donde se localizan principalmente lípidos como el colesterol y algunas proteínas importantes como las dinaminas para la fusión de las vesículas, las cavinas para inducir la curvatura en la membrana o la caveolina-1 necesaria para el mantenimiento y la formación de la caveola.<sup>247</sup> Además, la caveolina-1 está involucrada en el transporte vesicular dentro de este tipo de endocitosis y se ha demostrado que esta proteína se une a Rab5, la cual participa en el transporte entre los endosomas tempranos y el caveosoma, controlando su actividad.<sup>248</sup> Estudios con nanopartículas de sílice muestran que la caveolina-1, junto con la proteína cdc42, media la endocitosis en células HeLa.<sup>249</sup> Los resultados muestran la sobreexpresión de CAV-1 ( $R_{\text{SILAC}} = 2.64$ ) debida al efecto de las nanopartículas, lo que puede explicar la ruta de

endocitosis por la cual se produce la internalización de los agregados de NPs que se observan en el estudio de localización celular.

La endocitosis mediada por clatrina se basa en la interacción de varias proteínas con la clatrina, que es el principal efector del recubrimiento de la membrana para formar vesículas. Otras proteínas involucradas en este proceso son las proteínas adaptadoras como AP2, epsinas, dinaminas y proteínas de unión a la actina como cortactina, CTTN.<sup>250-252</sup> Estudios previos han demostrado que la CTTN participa tanto en la endocitosis mediada por clatrina, donde es necesaria como componente de las cavidades recubiertas de clatrina, como en la endocitosis mediada por receptores.<sup>250</sup> Dentro de las proteínas inhibidas se encuentra la cortactina ( $R_{\text{SILAC}} = -1.67$ ). Esta desregulación podría corroborar la sobreexpresión de la CAV-1 y confirmar la endocitosis mediada por caveolas.

Por otro lado, la proteína PACSIN3, la sindapina, forma parte de una familia de proteínas citoplasmáticas que están implicadas en la formación y transporte de vesículas. En particular, se conoce la relación de dicha proteína, al igual que del resto de isoformas de la misma, en el reclutamiento de proteínas que interaccionan con ella en los sitios de endocitosis. Existen estudios previos que han demostrado que una sobreexpresión de PACSIN3 da lugar a un bloqueo de la endocitosis de la transferrina, la cual es un marcador de la ruta mediada por clatrina <sup>253</sup>. Los resultados obtenidos muestran una inhibición de la proteína PACSIN3 ( $R_{\text{SILAC}} = -1.85$ ), lo que podría confirmar la formación de vesículas y la internalización de nanopartículas independiente de clatrina.

Previamente, se ha demostrado que la exposición a las **TiO<sub>2</sub>-NPs** induce roturas de la doble cadena de ADN y la parada del ciclo celular en varias líneas celulares.<sup>160,254-256</sup> De acuerdo con estos estudios, los resultados obtenidos en la presente Tesis, demuestran la alteración de algunas proteínas implicadas en mitosis: RanGAP1, NCAPG y EIF4G2 o que participan en varios puntos del ciclo celular, como MYBBP1A ( $R_{\text{SILAC}} = -1.72$ ), PSME3 ( $R_{\text{SILAC}} = 1.79$ ) y PPM1G.

La proteína RanGAP1 se precisa para la hidrólisis de GTP a GDP bajo un ciclo del sistema Ran. Dicho ciclo incluye el control del transporte nucleocitoplasmático de efectores importantes en la regulación de la mitosis, así como el balance entre los niveles de las especies RanGTP y RanGDP.<sup>257,258</sup> Los niveles de RanGTP en el núcleo marcan la formación de los microtúbulos y la transformación adecuada hacia los cromosomas durante la interfase. Además, RanGAP1 ( $R_{\text{SILAC}} = -2.09$ ) se asocia con husos mitóticos, por lo que varios estudios demuestran que la desregulación de esta proteína desencadena la parada del ciclo celular durante la fase mitótica y la desregulación de las proteínas involucradas en el control del ciclo celular.<sup>259-261</sup> NCAPG es la subunidad reguladora del complejo de condensinas para la conversión de la cromatina en los cromosomas mitóticos durante la interfase.<sup>262</sup> Esta proteína

está implicada, por tanto, en la regulación del ciclo celular y estudios previos han demostrado que una inhibición de NCAPG ( $R_{\text{SILAC}} = -1.68$ ) provoca un deterioro de la proliferación celular y la consecuente parada del ciclo celular.<sup>263</sup> El factor EIF4G2 ( $R_{\text{SILAC}} = -2.51$ ), conocido también como DAP-5, está involucrado directamente en la regulación de la traducción de proteínas importantes en la mitosis, como Cdk1, o proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2. Estudios previos demuestran que una inactivación génica de EIF4G2 supone la inducción de la muerte celular dependiente de la caspasa específica de la fase M, por lo tanto, EIF4G2 es necesario para mantener la supervivencia celular durante la mitosis.<sup>264,265</sup> La exposición a las **TiO<sub>2</sub>-NPs** provoca una inhibición de estas tres proteínas (RanGAP1, NCAPG y EIF4G2), lo que favorece la parada del ciclo celular, ya observada mediante citometría de flujo, y la reducción de la proliferación celular debido a la disminución de la traducción de proteínas importantes en la interfase, junto con un defecto en los cromosomas y en la formación de huso mitótico necesario para la salida de mitosis.

Por otro lado, PPM1G, también conocida como PP2C $\gamma$ , es una serina-treonina fosfatasa importante en la progresión del ciclo celular. Diversos estudios verifican que una sobreexpresión de la proteína PPM1G induce una acumulación de células en fase S.<sup>266</sup> La sobreexpresión de esta proteína que se puede observar en los resultados obtenidos en este estudio ( $R_{\text{SILAC}} = 2.90$ ), confirma el aumento de células en la fase S/G2-M obtenido mediante citometría de flujo y respalda la reducción de los niveles de ARNm de Cdk2 y Ciclina A, implicadas en la progresión de la fase S a la G2, que se comentó previamente.

Tal y como se ha comentado anteriormente otro de los efectos importantes producido por las **TiO<sub>2</sub>-NPs** es el aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), induciendo así estrés oxidativo y el consecuente desequilibrio en el estado redox normal de las células.<sup>160,244,267</sup> Diferentes enzimas con propiedades antioxidantes como la superóxido dismutasa [Mn], SOD2 o Mn-SOD, llevan a cabo los mecanismos de defensa de las células contra el estrés oxidativo. Esta proteína mitocondrial está involucrada en la conversión de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en el control del balance de ROS. La inhibición de la proteína SOD2, que se muestra en los resultados obtenidos ( $R_{\text{SILAC}} = -2.71$ ), confirma el desequilibrio de las especies reactivas de oxígeno y los resultados de citotoxicidad observados en estudios previos.<sup>267</sup> Además de este tipo de enzimas antioxidantes existen otras proteínas con características similares que, a su vez, están involucradas en la respuesta inmune, la proliferación, la apoptosis y la respuesta al estrés, como es el caso de la familia de las peroxidasas. La sobreexpresión de PRDX5 ( $R_{\text{SILAC}} = 1.88$ ), también conocida como AOEB166 o PMP20, sugiere el desarrollo de un papel protector en procesos de estrés oxidativo e inflamatorios.<sup>268</sup> PRDX5 está involucrada en la reducción de peróxidos mediante el empleo de compuestos reductores derivados de la tioredoxina (TXN), pero esta enzima es, también, una reductasa de peroxinitrito. Por lo tanto, el aumento de la

regulación de esta enzima podría ser un mecanismo alternativo de las células contra algunas especies reactivas de oxígeno.

Debido al estrés oxidativo generado el sistema del complemento se activa. Este sistema pertenece a una parte del sistema inmunológico que mejora la capacidad de los anticuerpos y las células fagocíticas para reconocer y eliminar los patógenos. El sistema incluye diferentes vías como la vía del complemento de lectina (LCP). El LCP es una cascada independiente de anticuerpos que se inicia mediante la unión de la lectina con sitios de unión a la manosa (MBL), a la superficie celular de los patógenos. Varios estudios demuestran que la activación de esta vía está mediada por la unión de MBL a las citoqueratinas.<sup>269</sup> Además, se ha demostrado previamente que la internalización de **TiO<sub>2</sub>-NPs** da lugar a respuestas inflamatorias.<sup>159,270</sup> Las queratinas son efectores importantes en el control de la red inflamatoria de los queratinocitos. En particular, la citoqueratina 1 desempeña un papel importante en la formación de la barrera epidérmica y en la restricción de la liberación de IL-18. Los estudios previos han demostrado que una reducción de esta queratina causa una liberación de IL-18 y un aumento de los factores inflamatorios.<sup>271</sup> Por ello, la inhibición de esta proteína que muestran los resultados ( $R_{\text{SILAC}} = -1.82$ ), indica un potencial aumento de las citoquinas inflamatorias que promueven el estrés y la inflamación debido a la presencia de las NPs.

Seguidamente a este estudio de expresión diferencial de proteínas en el lisado total, se lleva a cabo un estudio de las alteraciones en las proteínas de membrana. Mediante este estudio se puede conocer información sobre los mecanismos moleculares por los cuales las nanopartículas son internalizadas en las células, a la vez que se pueden evaluar los distintos receptores y las rutas de señalización en los que éstos participan, y que se encuentran alterados tras la exposición a las nanopartículas.

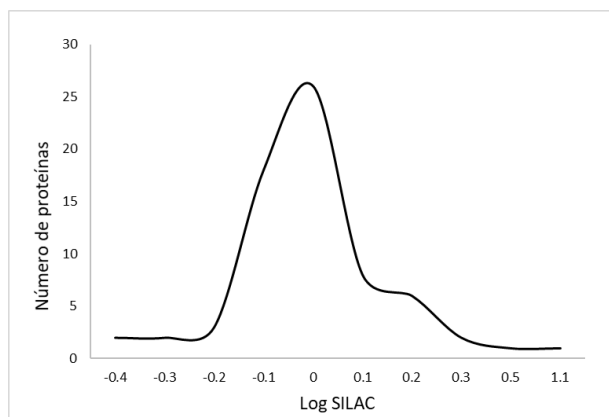
Los resultados permiten la identificación de 200 proteínas con una tasa de falsos positivos del 0.37%. En este caso, se observa una mayor precisión en los resultados por lo que el umbral de significación se fija en cocientes SILAC por encima de +1.3 para proteínas sobreexpresadas y en por debajo de -1.3 para proteínas inhibidas. De las 69 proteínas que cumplen los criterios de cuantificación, 24 de ellas se encuentran desreguladas (Tabla IV-5). De éstas, 11 se encuentran sobreexpresadas y 13 inhibidas.



Tabla IV-5. Tabla de proteínas desreguladas obtenidas en el estudio de proteínas de membrana para la evaluación del potencial citotóxico de las *TiO<sub>2</sub>-NPs*.

Número gi	Nombre proteína	Nombre común	R <sub>SILAC</sub>	RSD <sub>SILAC</sub>
105990514	filamin-B isoform 2 [Homo sapiens]	FLNB	-2.77	5.7
7669492	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 1 [Homo sapiens]	GAPDH	-2.59	7.7
4758950	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor [Homo sapiens]	PPIB	-2.06	18.1
33286418	pyruvate kinase isozymes M1/M2 isoform a [Homo sapiens]	PKM	-2.03	8.1
4501891	alpha-actinin-1 isoform b [Homo sapiens]	ACTN1	-1.76	15.7
29725609	epidermal growth factor receptor isoform a precursor [Homo sapiens]	EGFR	-1.76	6.6
19743813	integrin beta-1 isoform 1A precursor [Homo sapiens]	ITGB1	-1.43	18.9
61744477	4F2 cell-surface antigen heavy chain isoform b [Homo sapiens]	SLC3A2	-1.41	19.3
71979932	large neutral amino acids transporter small subunit 1 [Homo sapiens]	SLC7A5	-1.38	11.1
34147630	elongation factor Tu, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	TUFM	-1.36	12.9
47132620	keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal [Homo sapiens]	KRT2	-1.35	18.3
41322912	plectin isoform 1f [Homo sapiens]	PLEC	-1.31	18.8
5031839	keratin, type II cytoskeletal 6A [Homo sapiens]	KRT6A	-1.31	14.3
67782365	keratin, type II cytoskeletal 7 [Homo sapiens]	KRT7	1.30	19.6
27436946	lamin isoform A [Homo sapiens]	LMNA	1.41	19.2
55770844	catenin alpha-1 [Homo sapiens]	CTNNA1	1.44	18.7
25092737	histone H2A type 1-A [Homo sapiens]	HIST1H2AA	1.50	15.6
117189975	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 isoform a [Homo sapiens]	HNRNPC	1.55	8.2
4757756	annexin A2 isoform 2 [Homo sapiens]	ANXA2	1.59	17.6
195972866	keratin, type I cytoskeletal 10 [Homo sapiens]	KRT10	1.60	15.7
55956899	keratin, type I cytoskeletal 9 [Homo sapiens]	KRT9	1.91	14.2
119395750	keratin, type II cytoskeletal 1 [Homo sapiens]	KRT1	2.04	18.5
16751921	dermcidin preproprotein [Homo sapiens]	DCD	3.54	13.2
119703753	keratin, type II cytoskeletal 6B [Homo sapiens]	KRT6B	11.47	0.3

Con respecto a la distribución de la proporción de cocientes SILAC, la mayoría de las proteínas identificadas presentan unos valores cercanos a 1, confirmando una mezcla correcta de las dos poblaciones celulares en proporción 1:1 (Figura IV.26).



*Figura IV.26. Distribución de los cocientes SILAC para las proteínas cuantificadas tras la purificación de proteínas de membrana.*

Dentro de las proteínas inhibidas se encuentran varias que están implicadas directamente en procesos de cicatrización y restauración de heridas, como es el caso de ACTN1 ( $R_{\text{SILAC}} = -1.76$ ), ITGB1 ( $R_{\text{SILAC}} = -1.43$ ), KRT6A ( $R_{\text{SILAC}} = -1.31$ ), PKM ( $R_{\text{SILAC}} = -2.03$ ), SLC3A2 ( $R_{\text{SILAC}} = -1.41$ ) y SLC7A5 ( $R_{\text{SILAC}} = -1.38$ ). En la Figura IV.27 se muestran las proteínas inhibidas relacionadas entre sí mediante la herramienta STRING.<sup>272,273</sup> Estos resultados demuestran una reducción de la capacidad de las células de recuperación frente a daño tras el tratamiento con las nanopartículas. Además, algunas de estas proteínas son importantes en la conformación estructural y movilidad celular como la ACTN1, ITGB1 y KRT6A o en otros procesos como el transporte de aminoácidos, como es el caso de SLC3A2<sup>274</sup>, también conocida como 4F2hc, y SLC7A5<sup>275</sup> conocida también como hLAT1. Estas últimas participan en el transporte de leucina, que es un aminoácido importante para la activación de mTOR y de su ruta de señalización que afecta al crecimiento celular.

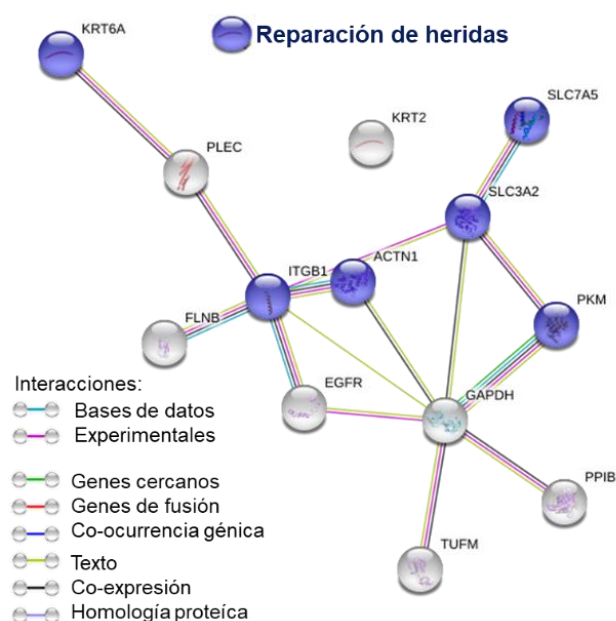


Figura IV.27. Proteínas inhibidas relacionadas mediante la herramienta STRING. Proteínas que participan en la reparación de heridas y cicatrización (azul).

Otra de las proteínas inhibidas es EGFR ( $R_{\text{SILAC}} = -1.76$ ), el cual es un receptor de membrana importante en la activación de diferentes rutas de señalización entre las que se encuentran la ruta JAK/SRC (proliferación), Ras/Raf/MEK (expresión de genes y progresión del ciclo celular) y PI3K/Akt (sensibilidad a estrés e inhibición de apoptosis, incluso activación de proliferación mediante la activación de mTOR dependiente de Akt), entre otras.<sup>276</sup> De tal forma que la inhibición de esta proteína debido a los efectos de las **TiO<sub>2</sub>-NPs** provoca una reducción de la señalización iniciada por este receptor afectando tanto a la expresión de genes y la sensibilidad a estrés como a la proliferación y al ciclo celular, tal y como se ha observado en el resto de ensayos realizados en la presente Tesis, aportando así otro mecanismo molecular que explica la reducción de la viabilidad observada y el arresto del ciclo celular.

Dentro de las proteínas sobreexpresadas por el efecto de las nanopartículas se pueden observar algunas queratinas como KRT10 ( $R_{\text{SILAC}} = 1.60$ ), KRT9 ( $R_{\text{SILAC}} = 1.91$ ) y KRT1 ( $R_{\text{SILAC}} = 2.04$ ), que son importantes en procesos de queratinización, así como en la formación de vesículas.<sup>277</sup> Por otro lado, se muestra la sobreexpresión de la proteína ANXA2 ( $R_{\text{SILAC}} = 1.59$ ), la cual está involucrada en diferentes funciones como las interacciones célula-célula, diferenciación e incluso procesos de exocitosis y endocitosis.<sup>278,279</sup> La sobreexpresión observada en esta proteína por el efecto de las **TiO<sub>2</sub>-NPs** puede justificar la formación de las vesículas para la endocitosis de las nanopartículas, y confirmar la localización observada mediante TEM de los cúmulos de partículas en el interior celular. Otra proteína que presenta funciones en la interacción celular y la conformación del citoesqueleto es la  $\alpha$ -catenina,

CTNNA1 ( $R_{\text{SILAC}} = 1.44$ ). Esta proteína principalmente sirve de unión entre la E-cadherina y la  $\beta$ -catenina, de tal forma que, además de su implicación en adhesión celular, participa en la regulación de la ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina. Diversos estudios demuestran que CTNNA1 inhibe la señalización iniciada por  $\beta$ -catenina<sup>280</sup> y por ello una sobreexpresión de esta proteína supone una represión de la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina.<sup>281,282</sup> Pero esta ruta no es la única que se ve afectada por la  $\alpha$ -catenina puesto que también inhibe la señalización mediada por Ras y NF- $\kappa$ B.<sup>282</sup>

#### *IV.2.d. Evaluación de la aplicación de nanosistemas híbridos proteína-Ag en tratamientos contra el cáncer*

El siguiente estudio tiene como objetivo el desarrollo de nuevas terapias potencialmente efectivas contra el cáncer. En base a todos los avances en el campo de la nanomedicina comentados anteriormente, la propuesta inicial implicaba la posibilidad de modificación de partículas de dióxido de titanio para la mejora de sus propiedades en terapias anti-tumorales. No obstante, en base a los resultados obtenidos sobre citotoxicidad de las **TiO<sub>2</sub>-NPs** y a diferentes estudios aparecidos en la literatura durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, finalmente se optó por una alternativa más biocompatible, en concreto por un nanosistema híbrido que permita transportar un agente anti-tumoral de forma dirigida y selectiva a células enfermas. Así, el objetivo de este estudio es la aplicación de un nanomaterial de sílice mesoporosa modificado con una proteína de vectorización, como es la transferrina, para el transporte selectivo de nanopartículas de plata como agente anti-tumoral.

##### *IV.2.d.1. Evaluación de la internalización selectiva de los materiales con proteína de vectorización mediante citometría de flujo*

En primer lugar, se evalúa la internalización celular selectiva de los materiales MSNs funcionalizados con Tf, como agente de vectorización, en dos líneas celulares. Ambas líneas, HepG2, que corresponden con células de hepatocarcinoma, y HaCaT, las cuales son queratinocitos inmortalizados, se seleccionan debido a los niveles de expresión del receptor de transferrina (TfR) que muestran (Figura IV.28). Este receptor presenta dos isoformas: TfR1 y TfR2. La isoforma TfR1 se expresa a bajos niveles en las células sanas y es un receptor de tipo II que actúa como el principal responsable de la entrada de hierro (unido a la Tf) en la célula. Este receptor reside en la membrana celular externa y se recicla en los endosomas ácidos dentro de la célula por una vía dependiente de clatrina para, finalmente, liberar el hierro y regresar a la membrana celular.<sup>283,284</sup> La isoforma TfR2 se expresa principalmente en el hígado y el intestino y su expresión está regulada por el ciclo celular. Aunque es capaz de unirse a la transferrina para internalizar el hierro, tiene menos afinidad que la isoforma TfR1.<sup>285</sup>

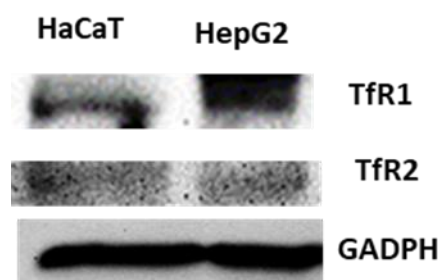


Figura IV.28. Análisis de expresión de las dos isoformas del receptor de transferrina, TfR1 y TfR2 mediante ensayo Western blot. La proteína GADPH se emplea como control de carga del experimento.

La proliferación descontrolada de las células cancerosas implica una mayor necesidad de hierro y, por consiguiente, una mayor expresión de TfR1 en estas células al compararse con las células sanas.<sup>286</sup> Este hecho convierte a este receptor en una diana atractiva para la administración dirigida de agentes terapéuticos contra las células cancerosas.<sup>151,284</sup> Además, algunos estudios muestran que la línea celular de hepatocarcinoma humano, HepG2, tiene altos niveles de TfR2.<sup>287</sup> Teniendo en cuenta que los conjugados de transferrina, como las nanopartículas funcionalizadas con esta proteína, pueden interactuar con ambas isoformas, TfR1 y TfR2, se decide evaluar la internalización celular en las dos líneas seleccionadas (HepG2 y HaCaT) que presentan diferente expresión de ambos receptores.

Para llevar a cabo la evaluación de la internalización se emplea la técnica de citometría de flujo. Las células se incuban con 100  $\mu\text{g/mL}$  de los materiales **MSNs**, **MSNs-BSA** y **MSNs-Tf** durante 24 h y posteriormente se procede a cuantificar la intensidad de las células vivas que exhiben fluorescencia verde, correspondiente con los materiales a evaluar, los cuales presentan marcaje con FITC. Como se muestra en la Figura IV.29, la funcionalización con Tf (**MSNs-Tf**) mejora la internalización de los materiales en ambas líneas celulares en comparación con las **MSNs** y las **MSNs-BSA**, lo que corrobora la internalización celular mediada por el receptor de transferrina (TfR).<sup>288</sup> Aunque se encuentran diferencias mayores cuando se evalúa la internalización en las células HepG2 entre los tres materiales, también hay diferencias significativas en el caso de la línea celular HaCaT. Sin embargo, se observan diferencias en la selectividad de internalización entre las dos líneas celulares, tal y como muestran los histogramas de la citometría de flujo (Figura IV.29). Mientras que las células HepG2 presentan una señal de fluorescencia más alta correspondiente a la internalización de **MSNs-Tf** (Figura IV.29 C), el desplazamiento de la señal de fluorescencia de dicho material, en el caso de las células HaCaT, no es tan pronunciado en comparación con los otros materiales. Estos resultados pueden ser sustentados por el aumento de los niveles de expresión de los receptores de transferrina en las células HepG2 en comparación con las células HaCaT (Figura IV.29 B). Por otro lado, la mayor internalización de los materiales **MSNs-BSA** en comparación

con las **MSNs** desnudas puede atribuirse a una mejor dispersión de los nanosistemas en el medio de cultivo celular debido a la mayor estabilización una vez que las **MSNs** son funcionalizados con las proteínas, como se refleja en la disminución del máximo de la distribución de tamaño hidrodinámico, comentado en el apartado III.2.c.1 de la presente Tesis.

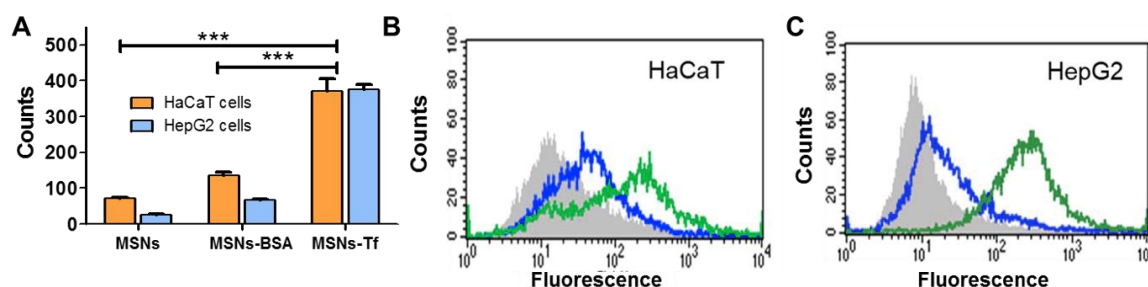


Figura IV.29. Internalización celular de los materiales **MSNs** evaluados en células HepG2 y HaCaT expuestas a 100  $\mu\text{g/mL}$  de **MSNs**, **MSNs-BSA** y **MSNs-Tf** durante 24 h (A). Significación estadística: \*\*\* $p < 0,001$ . Histogramas de citometría de flujo de la internalización celular de **MSNs** (área gris), **MSNs-BSA** (línea azul) y **MSNs-Tf** (línea verde) evaluados en células HaCaT (B) y células HepG2 (C).

#### IV.2.d.2. Evaluación de la viabilidad celular tras la exposición a los diferentes materiales

Una vez que se ha comprobado la eficacia de la vectorización, se evalúa la toxicidad de los nanosistemas que contienen nanopartículas de plata (**MSNs-Proteína-AgNPs**) en comparación con las **MSNs** desnudos y las **MSNs** funcionalizados con proteína (**MSNs-Proteína**). Este estudio se realiza evaluando la viabilidad de las células expuestas a diferentes concentraciones de los materiales durante diferentes tiempos de exposición (24, 48 y 72 h). Según los resultados obtenidos en el ensayo de vectorización y puesto que las células HepG2 presentan mayor selectividad, se selecciona esta línea como principal para los ensayos sucesivos.

La Figura IV.30 muestra que la viabilidad celular, cuando las células HepG2 se exponen a los materiales **MSNs** o **MSNs** funcionalizados con las proteínas (**MSNs-BSA** y **MSNs-Tf**), no sufre cambios relevantes, especialmente a tiempos de exposición cortos.

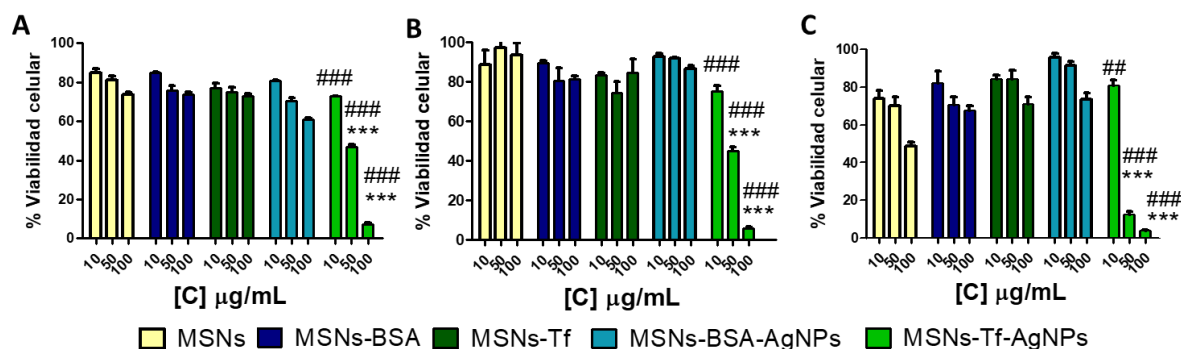


Figura IV.30. Viabilidad celular de las células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones (10, 50 y 100 µg/mL) de **MSNs**, **MSNs-BSA**, **MSNs-Tf**, **MSNs-BSA-AgNPs** y **MSNs-Tf-AgNPs** durante 24 (A), 48 (B) y 72 (C) h (n=5). Los datos fueron analizados por ANOVA, seguidos de una prueba de comparación múltiple por Bonferroni \*\*\*p < 0.001 frente a **MSNs-Tf**. ##p < 0.01 y ###p < 0.001 frente a **MSNs-BSA-AgNPs**.

Sin embargo, las células tratadas con nanopartículas de plata soportadas en **MSNs-Tf** (**MSNs-Tf-AgNPs**) presentan una reducción significativa de la viabilidad en función del tiempo y de la concentración en comparación con los otros materiales probados (Figura IV.30). De hecho, el material **MSNs-Tf-AgNPs** provoca la muerte celular en mayor medida que el material análogo decorado con BSA (**MSNs-BSA-AgNPs**). Teniendo en cuenta que los análisis EDX de ambos materiales mostraban relaciones Si/Ag similares, tal y como se comentó en el apartado III.2.d.3, este hecho puede explicarse por el aumento de la internalización celular de los materiales cuando se emplea la transferrina como ligando de vectorización en comparación con el material funcionalizado con BSA, lo que está de acuerdo con los resultados del ensayo anterior.

Además, cuando se compara la viabilidad de las células expuestas a **MSNs-Tf-AgNPs** con la viabilidad de las células expuestas al mismo material, pero sin AgNPs (**MSNs-Tf**), se observa una diferencia significativa para todas las condiciones ensayadas, especialmente a concentraciones más altas. Este hecho confirma que la disminución de la viabilidad celular observada es provocada por el efecto de los AgNPs transportadas selectivamente dentro de las células y no se debe al nanotransportador utilizado.

Teniendo en cuenta la reducción de viabilidad tan drástica a concentraciones altas, cuando las células se exponen a los materiales híbridos **MSNs-Tf-AgNPs**, se lleva a cabo la evaluación de la viabilidad celular a concentraciones intermedias. Como se observa en la Figura IV.31, a una concentración intermedia (25 µg/mL) con respecto a las evaluadas anteriormente ya se puede observar la reducción de viabilidad a tiempos de exposición más largos.

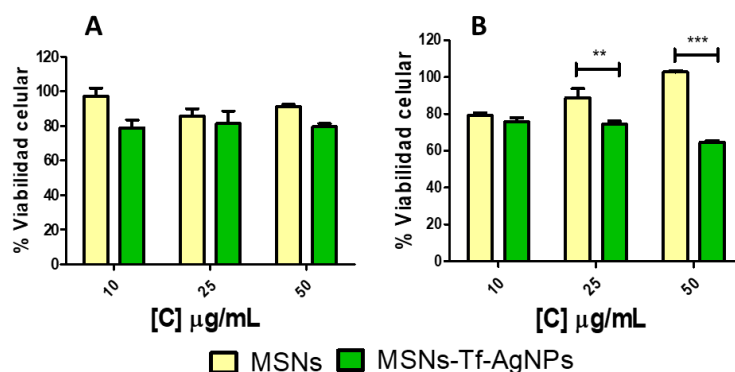


Figura IV.31. Ensayo de viabilidad celular a 24 h (A) y 48 h (B) de células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones (10, 25 y 50 µg/mL) de **MSNs** y **MSNs-Tf-AgNPs**. Los datos fueron analizados por ANOVA, seguidos de una prueba de comparación múltiple por Bonferroni  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$ .

Aunque la línea celular HaCaT mostraba menor selectividad en la internalización de los materiales de vectorización, la evaluación de la viabilidad celular muestra resultados similares a los encontrados en el caso de las células HepG2. Tal y como se observa en la Figura IV.32, la viabilidad en los cultivos tratados con los materiales híbridos **MSNs-Tf-AgNPs** sufre reducciones significativas y, al igual que en el caso de la otra línea celular, la comparación con el material homólogo, **MSNs-BSA-AgNPs**, y con el precursor **MSNs-Tf**, demuestran que dicha reducción es debida a la acción de las AgNPs que se internalizan en las células.

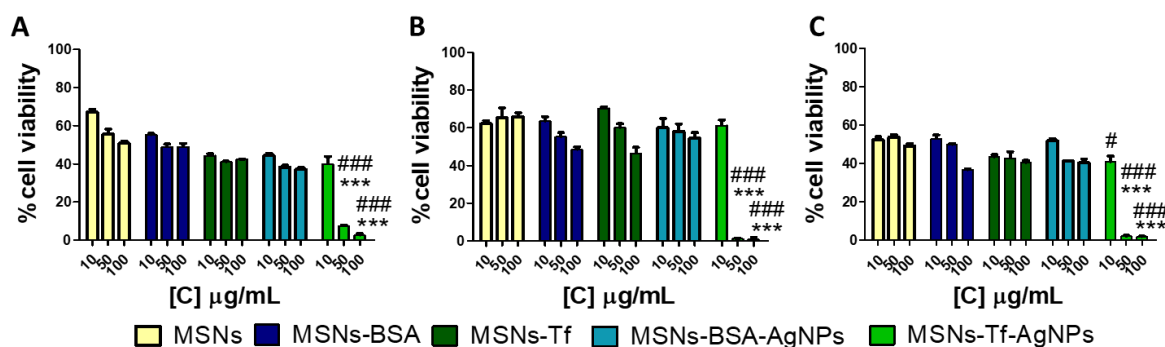


Figura IV.32. Viabilidad celular de las células HaCaT expuestas a diferentes concentraciones (10, 50 y 100 µg/mL) de **MSNs**, **MSNs-BSA**, **MSNs-Tf**, **MSNs-BSA-AgNPs** y **MSNs-Tf-AgNPs** durante 24 (A), 48 (B) y 72 (C) h (n=5). Los datos fueron analizados por ANOVA, seguidos de una prueba de comparación múltiple por Bonferroni  $^{***}p < 0.001$  frente a **MSNs-Tf**.  $^{\#}p < 0,05$  y  $^{###}p < 0.001$  frente a **MSNs-BSA-AgNPs**.

Para confirmar que la nucleación de AgNPs en el material **MSNs-Tf** no afecta a la internalización selectiva de estos materiales, se realiza otro ensayo de internalización, comparando los materiales **MSNs** y **MSNs-Tf-AgNPs** (Figura IV.33). La internalización del material **MSNs** es insignificante, mientras que para **MSNs-Tf-AgNPs** fue significativamente alta, lo que corrobora que, la nucleación de AgNPs sobre **MSNs** decorados con Tf, no provoca alteraciones en el proceso de internalización mediada por el receptor. Aunque cabe destacar



que la comparación directa entre el material **MSNs-Tf** y **MSNs-Tf-AgNPs** sería a su vez indicativo para descartar el efecto de la mejor redispersión entre el material **MSNs** y **MSNs-Tf**.

Los resultados obtenidos en la reducción de la viabilidad, así como en la internalización selectiva demuestran el potencial del nanosistema **MSNs-Tf-AgNPs** para el transporte selectivo hacia células enfermas de las AgNPs, las cuales presentan una elevada toxicidad incluso para las células sanas.

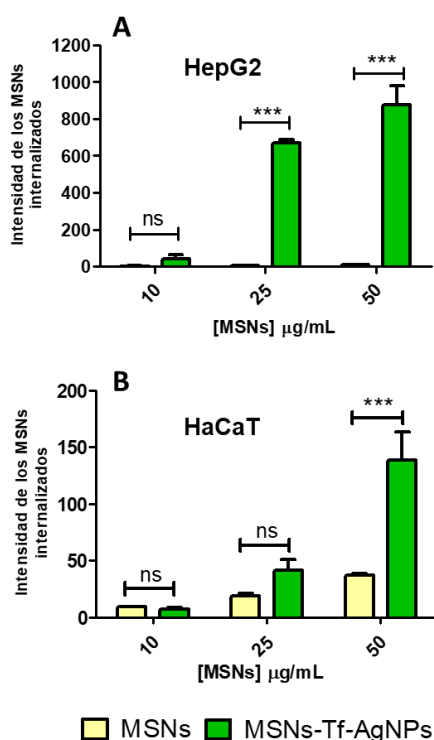


Figura IV.33. Internalización de materiales de MSNs en células HepG2 (A) y HaCaT (B) expuestas a diferentes concentraciones (10, 25 y 50 µg/mL) de **MSNs** y **MSNs-Tf-AgNPs** durante 24 h ( $n = 3$ ). Significación estadística: \*\*\* $p < 0.001$ . ns: no significante.

#### IV.2.d.3. Estudio de localización celular de los nanomateriales

Para conocer en profundidad el proceso de internalización y localización de las **MSNs-Tf-AgNPs** en las células HepG2, se lleva a cabo un análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de secciones celulares. Adicionalmente, este ensayo permite conocer en mayor detalle los efectos que producen las AgNPs transportadas al interior celular. Las micrografías obtenidas tras el tratamiento de las células HepG2 a 25 y 50 µg/mL con **MSNs-Tf-AgNPs** se muestran en la Figura IV.34 donde se pueden observar las diferencias entre las células control (Figura IV.34 A) y las células tratadas con el nanosistema (Figura IV.34 B-E). Mientras que las células control (no tratadas) no muestran anomalías, las células tratadas con el nanosistema exhiben grandes endosomas con nanopartículas en su interior y, por lo

tanto, un mayor grado de vacuolización. Este hecho concuerda con el mayor grado de internalización y reducción de la viabilidad celular observado anteriormente, a medida que aumenta la concentración del nanosistema y los tiempos de exposición (Figura IV.29, Figura IV.30 y Figura IV.31).

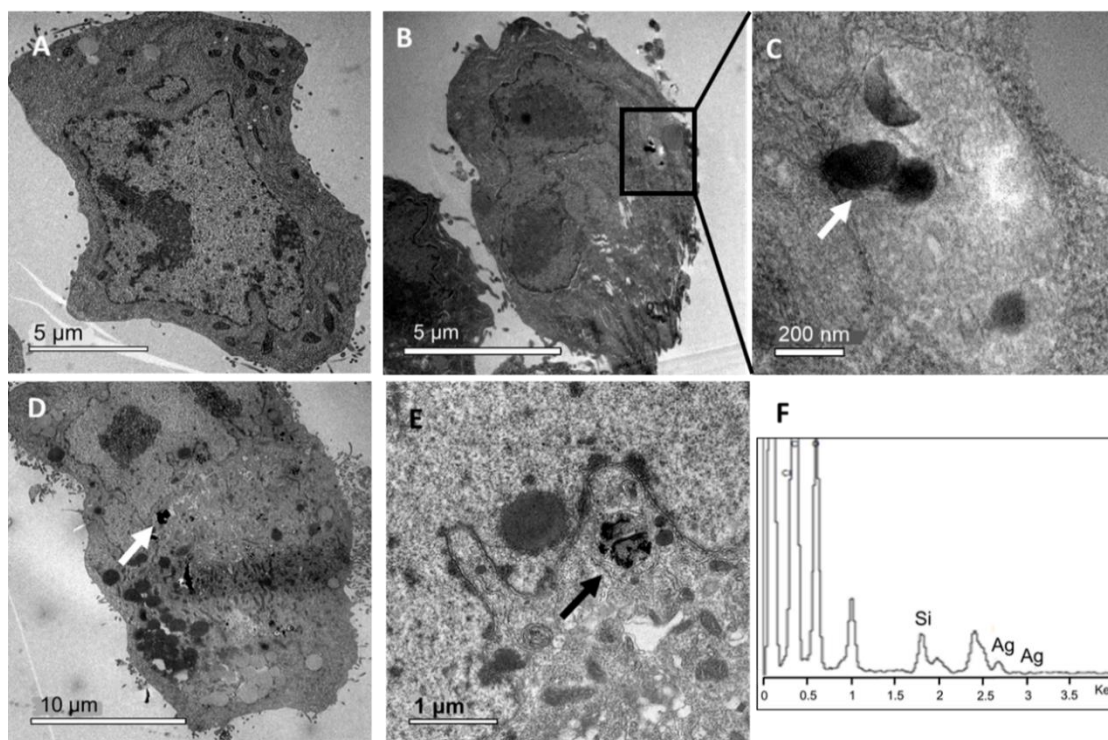
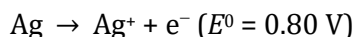
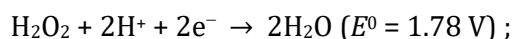


Figura IV.34. Imágenes de secciones ultrafinas de células HepG2 expuestas a **MSNs-Tf-AgNPs** obtenidas mediante TEM. Células control (A), células HepG2 expuestas a 25 μg/mL durante 24 h (B y C) y a 50 μg/mL durante 48 h (D y E) con **MSNs-Tf-AgNPs**. Análisis EDS de las células tratadas (F). Las flechas indican la localización de MSNs.

Los nanosistemas se localizan principalmente en lisosomas como se esperaba según el mecanismo de internalización celular mediado por el receptor de transferrina (TfR) que se emplea para la vectorización (Figura IV.34 B y C). Además, este nanosistema no presenta ninguna modificación que permita la activación de un mecanismo de escape endosomal rápido.<sup>289,290</sup> Debido a estos hechos, y considerando el tamaño del nanosistema, las MSNs no pueden penetrar la membrana nuclear (Figura IV.34 E).<sup>291</sup> Por otra parte, probablemente la acción de las proteasas lisosómicas degrada la proteína Tf anclada en la superficie externa del nanosistema y, por lo tanto, tanto las AgNPs como las MSNs pierden su protección.<sup>292,293</sup> Por esta razón se podría esperar encontrar AgNPs libres pero, sin embargo, no se observan AgNPs en el interior de las células, ni libres ni soportadas en el nanotransportador, por lo que debe haberse producido la disolución de las nanopartículas metálicas. Este hecho puede explicarse con el mecanismo denominado "*efecto caballo de Troya potenciado por lisosomas*",<sup>294</sup> en el cual

se describe como las nanopartículas metálicas internalizadas por mecanismos activos de endocitosis pueden liberar iones tóxicos debido a la degradación de las mismas promovida por las condiciones ácidas del ambiente lisosómico (pH 4.5-5.0). Como se ha descrito en estudios anteriores sobre la toxicidad de las AgNPs, una de las reacciones químicas que pueden estar implicadas en este proceso también conlleva la reacción con especies reactivas de oxígeno (ROS) que, a su vez, son causadas por la presencia de AgNPs e iones  $\text{Ag}^+$ :<sup>176,295,296</sup>



En base a todo lo expuesto, se puede plantear una hipótesis que explicaría que los efectos tóxicos de las nanopartículas de plata se basan en los iones metálicos ( $\text{Ag}^+$ ) liberados como efectores de las cascadas de activación responsables del daño en las membranas mitocondriales, las alteraciones del estado redox y el aumento de la producción de ROS, la apoptosis, la desregulación del ciclo celular y el daño del ADN, entre otros.<sup>297</sup> La presencia de estos iones  $\text{Ag}^+$  dentro de las células se confirma por el análisis por espectroscopia de energía dispersiva de Rayos X (EDS) de las células expuestas al nanosistema (Figura IV.34 F).<sup>294,298,299</sup>

Por otro lado, las MSNs presentan signos de degradación, como la pérdida de su forma esférica (Figura IV.34 E), en función del tiempo de exposición evaluado, es decir, del tiempo transcurrido dentro del lisosoma. La sílice puede disolverse liberando ácido silícico en las condiciones del pH lisosómico, aunque su disolución es mucho más lenta que en el caso de las AgNPs.<sup>293,294</sup> El análisis EDS también confirma este hecho puesto que las nanopartículas que se encuentran dentro de los lisosomas contienen principalmente Si en su composición.

#### IV.2.d.4. Estudio de expresión diferencial de proteínas tras el tratamiento con los nanosistemas desarrollados

La reducción de la viabilidad de las células cancerígenas, HepG2, tras la exposición a los materiales que llevan las nanopartículas de plata como agentes terapéuticos (**MSNs-Tf-AgNPs**), así como los resultados obtenidos en los ensayos de internalización de los nanosistemas, ponen de manifiesto el potencial de dichos nanosistemas como terapias anti-tumorales. Sin embargo, y puesto que generalmente los mecanismos de acción de las terapias basadas en nanomateriales no son estudiados a nivel molecular, en la presente Tesis Doctoral nos hemos centrado en la realización de un estudio de expresión diferencial de proteínas con el fin de profundizar en los mecanismos biomoleculares responsables de los efectos ocasionados por el nanosistema terapéutico propuesto.

El estudio se basa en un experimento de marcaje metabólico SILAC para comparar la expresión de las proteínas en los cultivos tratados con el nanosistema y los cultivos control. Además, puesto que se observa una gran reducción de viabilidad celular tras la exposición al nanomaterial y en base a todos los efectos descritos previamente de nanopartículas de plata sobre el ciclo celular, apoptosis, daño en el ADN y estrés oxidativo, entre otros;<sup>176</sup> se decide realizar un estudio detallado de las proteínas de núcleo o que participan en procesos relacionados con el mismo. Para ello se lleva a cabo una purificación de distintas fracciones del contenido total de las proteínas.

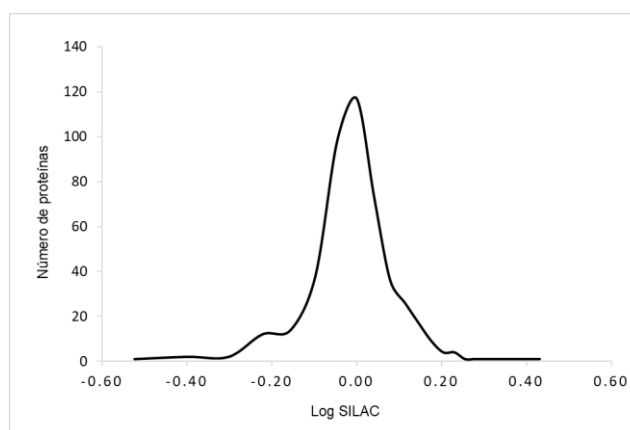
Los resultados de este estudio permiten la identificación de 822 proteínas de núcleo con una tasa de falsos positivos de 0.12%, de las cuales cumplen los criterios de cuantificación, comentados anteriormente, 451 proteínas. De acuerdo al umbral de significación fijado, proteínas con cocientes SILAC por encima de +1.5 se consideran sobreexpresadas, y proteínas con cocientes SILAC menores a -1.5, se consideran inhibidas. Se encuentran un total de 32 proteínas desreguladas (Tabla IV-6). De éstas, 15 aparecen sobreexpresadas y 17 inhibidas.

Tabla IV-6. Tabla de proteínas desreguladas obtenidas en el estudio del potencial antitumoral del nanosistema *MSNs-Tf-AgNPs*.

Número gi	Nombre proteína	Nombre común	R <sub>SILAC</sub>	RSD <sub>SILAC</sub>
194394237	Villin-1 [Homo sapiens]	VIL1	-3.34	13.73
119226260	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein [Homo sapiens]	CHERP	-2.85	4.69
261862348	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial isoform 3 [Homo sapiens]	SHMT2	-2.26	17.30
4506489	Replication factor C subunit 3 isoform 1 [Homo sapiens]	RFC3	-1.91	18.71
4557469	AP-2 complex subunit beta isoform b [Homo sapiens]	AP2B1	-1.90	8.30
56237027	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 isoform 1 [Homo sapiens]	IGF2BP1	-1.78	9.63
301171467	ATP-dependent RNA helicase DDX3X isoform 2 [Homo sapiens]	DDX3X	-1.77	19.17
98986457	Host cell factor 1 [Homo sapiens]	HCFC1	-1.67	11.74
4506701	40S ribosomal protein S23 [Homo sapiens]	RPS23	-1.65	10.25
11321585	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 [Homo sapiens]	GNB1	-1.61	14.35
5453740	Myosin regulatory light chain 12A [Homo sapiens]	MYL12A	-1.61	18.81
116256489	Septin-9 isoform c [Homo sapiens]	sep-09	-1.59	18.39

<b>4505917</b>	Exosome component 10 isoform 2 [Homo sapiens]	EXOSC10	-1.59	11.80
<b>15011936</b>	40S ribosomal protein S26 [Homo sapiens]	RPS26	-1.56	3.97
<b>4504897</b>	Importin subunit alpha-2 [Homo sapiens]	KPNA2	-1.56	19.75
<b>189491630</b>	Upstream-binding protein 1 isoform LBP-1b [Homo sapiens]	UBP1	-1.54	19.34
<b>24497603</b>	Nuclear pore glycoprotein p62 [Homo sapiens]	NUP62	-1.50	19.29
<b>10800130</b>	Histone H2A type 1-D [Homo sapiens]	HIST1H2AD	1.50	10.32
<b>5453994</b>	Double-strand-break repair protein rad21 homolog [Homo sapiens]	RAD21	1.57	19.53
<b>118601081</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 [Homo sapiens]	HNRNPUL2	1.60	4.51
<b>4505343</b>	Nuclear cap-binding protein subunit 1 [Homo sapiens]	NCBP1	1.60	12.42
<b>10863903</b>	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12 [Homo sapiens]	TRIP12	1.62	1.16
<b>4503571</b>	Alpha-enolase isoform 1 [Homo sapiens]	ENO1	1.68	2.87
<b>89179321</b>	Protein unc-45 homolog A isoform 3 [Homo sapiens]	UNC45A	1.68	11.73
<b>283436222</b>	ATPase family AAA domain-containing protein 3A isoform 2 [Homo sapiens]	ATAD3A	1.71	6.41
<b>4503529</b>	Eukaryotic initiation factor 4A-I isoform 1 [Homo sapiens]	EIF4A1	1.71	19.97
<b>4506675</b>	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 precursor [Homo sapiens]	RPN1	1.78	0.75
<b>19923653</b>	PC4 and SFRS1-interacting protein isoform 2 [Homo sapiens]	PSIP1	1.93	16.95
<b>101943240</b>	General transcription factor 3C polypeptide 1 [Homo sapiens]	GTF3C1	2.12	15.46
<b>14589866</b>	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase isoform a [Homo sapiens]	ASPH	2.21	14.65
<b>45593130</b>	Guanine nucleotide-binding protein-like 3 isoform 1 [Homo sapiens]	GNL3	2.58	8.80
<b>148839305</b>	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1 [Homo sapiens]	SMCHD1	2.66	7.37

Con respecto a la distribución de la proporción de cocientes SILAC, la mayoría de las proteínas identificadas presentan unos valores cercanos a 1, confirmando una mezcla correcta de las dos poblaciones celulares en proporción 1:1 (Figura IV.35).



*Figura IV.35. Distribución de los cocientes SILAC para las proteínas cuantificadas en el estudio de los efectos producidos por el material **MSNs-Tf-AgNPs**.*

Dentro de las proteínas desreguladas un gran número de ellas se encuentran relacionadas con la proliferación celular y la regulación del ciclo celular. La proteína CHERP es un importante regulador de la movilidad de los cationes  $\text{Ca}^{2+}$ , de tal forma que su desregulación implica alteraciones en la síntesis de ADN y el ciclo celular. La inhibición de esta proteína supone la inhibición de la ruta AKT/mTOR, resultando en una reducción de la proliferación celular y un aumento de la apoptosis en células de neuroblastoma.<sup>300</sup> Por otro lado, también se ha descrito que la inhibición de esta proteína en casos de leucemia supone una reducción de la Ciclina D1, lo que provoca una parada del ciclo celular.<sup>301</sup> La inhibición de CHERP ( $R_{\text{SILAC}} = -2.85$ ), inducida por el efecto de los nanosistemas de nuestro estudio podría confirmar la reducción de la proliferación observada en los ensayos previos. Además, la inhibición observada en otras proteínas, DDX3X ( $R_{\text{SILAC}} = -1.77$ ), KPNA2 ( $R_{\text{SILAC}} = -1.56$ ) y NUP62 ( $R_{\text{SILAC}} = -1.50$ ), así como la sobreexpresión de TRIP12 ( $R_{\text{SILAC}} = 1.62$ ), confirma la desregulación del ciclo celular como causa de la reducción de viabilidad observada. La proteína DDX3X es una diana terapéutica importante en cáncer, de tal manera que se ha demostrado que una reducción de dicha proteína supone una inhibición de la proliferación y el crecimiento a través de una parada en el ciclo celular impidiendo la transición G1/S.<sup>302</sup> La proteína KPNA2 se considera un marcador de tumores con peor prognosis en cáncer de mama<sup>303</sup>, colon<sup>304</sup>, hígado<sup>305</sup> y ovario<sup>306</sup>, entre otros. Esta proteína pertenece a la familia de las importinas y participa en numerosos procesos, entre los que se pueden destacar el transporte entre el núcleo y el citoplasma de proteínas importantes en el desarrollo tumoral, así como en la regulación de la proliferación a través de la progresión del ciclo celular. En concreto, se ha descrito que una inhibición de dicha proteína en carcinoma de ovario supone una reducción de c-Myc y de la Ciclina D1 acompañado de una activación de los inhibidores de CDKs, lo que supone una parada del ciclo celular.<sup>306</sup> La proteína NUP62 forma parte del complejo que conforma los poros nucleares, los cuales presentan gran interés en el

transporte de proteínas. Al igual que en el caso anterior, la inhibición de esta proteína supone una parada del ciclo celular. Por otro lado, la sobreexpresión de TRIP12 produce una inhibición de la proteína USP7 que termina produciendo una acumulación de las células en la fase S del ciclo celular.<sup>307</sup>

El ciclo celular se encuentra regulado por un gran número de proteínas, y en el caso de células tumorales, el gen supresor de tumores p53 desempeña un papel relevante ya que se encuentra implicado en la regulación de distintos puntos de control del ciclo celular.<sup>240</sup> De ahí, que esta proteína suponga una importante diana terapéutica contra el cáncer. El tratamiento de las células de hepatocarcinoma con los nanosistemas desarrollados ha provocado una inhibición en proteínas que regulan la estabilización de p53, como es el caso de RPS23 ( $R_{\text{SILAC}} = -1.65$ ) y RPS26 ( $R_{\text{SILAC}} = -1.56$ ). La reducción de ambas proteínas supone una activación de p53 por estabilización de la misma al evitar su degradación por MDM2, lo que conlleva un arresto del ciclo celular y una reducción de la proliferación celular.<sup>308,309</sup> A su vez, la sobreexpresión observada en la proteína GNL3 ( $R_{\text{SILAC}} = 2.58$ ), la cual está relacionada con la regulación de la proliferación celular a través de p53,<sup>310</sup> puede confirmar la estabilización de dicha proteína y el arresto del ciclo celular.<sup>311</sup>

Todos los hechos comentados anteriormente se corroboran por la desregulación de otras proteínas previamente descritas como potenciales dianas terapéuticas en hepatocarcinoma. Entre éstas podemos encontrar tres de las proteínas más inhibidas de nuestro estudio, SHMT2 ( $R_{\text{SILAC}} = -2.26$ ), RFC3 ( $R_{\text{SILAC}} = -1.91$ ) y IGF2BP1 ( $R_{\text{SILAC}} = -1.77$ ). La inhibición de SHMT2 supone una reducción de la tumorigenesis y puede asociarse a una parada del ciclo celular en la fase G1.<sup>312,313</sup> La reducción de RFC3 supone un bloqueo en la formación del complejo de replicación de ADN, del cual forma parte dicha proteína dando lugar a una supresión de la replicación de ADN así como a una parada del ciclo celular al impedirse la progresión entre las fases G1 y S.<sup>314</sup> Finalmente, la inhibición de IGF2BP1 supone una reducción de la proliferación.<sup>315</sup> Los efectos descritos tras la inhibición de estas proteínas diana sobre las células de hepatocarcinoma confirman el potencial de los nanosistemas desarrollados.

Al igual que la desregulación del ciclo celular, los procesos de muerte celular, como la apoptosis, suponen un mecanismo para frenar el crecimiento de las células tumorales. Por ello, en nuestro estudio podemos destacar proteínas que participan en dicho proceso y las cuales se encuentran desreguladas por el efecto de los nanosistemas. Una de las proteínas que se encuentra más inhibidas, y sobre la cual ya se ha comentado su participación en la proliferación y el ciclo celular, es CHERP ( $R_{\text{SILAC}} = -2.85$ ). Esta proteína presenta interés en la activación de la apoptosis debido a un incremento del estrés endoplasmático que



conlleva la activación de DR5 que es un receptor inductor de apoptosis. Este proceso acompaña a la inactivación de la ruta Akt/mTOR lo que supone la reducción de la proliferación que se ha comentado previamente.<sup>300</sup> Otra de las proteínas inhibidas que son importantes en este proceso es la IGF2BP1 ( $R_{SILAC} = -1.77$ ), la cual es una proteína de unión al ADN que participa en la estabilización y la expresión de diferentes ARNm. Entre las proteínas que se expresan debido a la acción de IGF2BP1 se encuentran c-Myc y Ki-67 que son reguladores directos de la proliferación celular y la apoptosis. De tal forma que una inhibición de IGF2BP1, reduce la expresión de dichas proteínas y favorece la apoptosis en células de hepatocarcinoma.<sup>315</sup>

En base al potencial que muestran los nanosistemas para la desregulación de proteínas importantes en la proliferación de células cancerígenas, es importante destacar que algunas de las proteínas inhibidas presentan implicación en procesos de metástasis e invasión tumoral, tal y como se ha descrito en la bibliografía. Tal es el caso de DDX3X<sup>302,316</sup> ( $R_{SILAC} = -1.77$ ), de tal forma que la supresión o reducción de los niveles de dicha proteína supone una disminución de la capacidad de invasión tumoral. En concreto la inhibición de la proteína DDX3X produce una reducción de las proteínas Rac-1 y  $\beta$ -catenina, lo que provoca un aumento en la adhesión de las células y una disminución de su movilidad y, por tanto, la carga metastásica, tal y como se ha demostrado en cáncer de mama y pulmón.<sup>302</sup> Otra de las proteínas que participa en procesos de metástasis es la AP2B1, cuya inhibición, observada en nuestro estudio ( $R_{SILAC} = -1.90$ ), fomenta la degradación de las estructuras relacionadas con la migración de las células cancerosas.<sup>317,318</sup>

Sin embargo, y como era de esperar debido a los diferentes mecanismos moleculares que se activan debido a agentes externos a las células,<sup>246,319</sup> en este estudio podemos encontrar proteínas implicadas en procesos de respuesta a estrés, respuesta a estímulos y de defensa celular. Una de las proteínas sobreexpresada por el efecto de los nanosistemas es la PSIP1 ( $R_{SILAC} = 1.93$ ), también conocida como LEDGF/p75, cuya función es la defensa celular frente a estrés, mediante la unión a factores de transcripción y la activación de genes antioxidantes o con relación en procesos antiinflamatorios o de estrés.<sup>320</sup> Algunas de las proteínas alteradas, además de con respuesta a estrés se relacionan directamente con daños en el ADN, como HNRNPUL2 ( $R_{SILAC} = 1.60$ ), RAD21 ( $R_{SILAC} = 1.57$ ) y SMCHD1 ( $R_{SILAC} = 2.66$ ). La acumulación de estas proteínas en las células, cuya finalidad es la reparación del material genético para la supervivencia celular, viene determinada por un daño en la doble hebra del ADN.<sup>321-323</sup>

Es importante tener en cuenta que, a pesar de que las células cancerígenas muestran mecanismos de defensa al ser expuestas al nanosistema propuesto, el potencial antitumoral del mismo sigue ofreciendo una buena actividad terapéutica. No obstante, dicha actividad



podría verse incrementada mediante la presencia de agentes terapéuticos adicionales incorporados en los nanosistemas, y que pudieran ser efectivos contra los mecanismos de defensa que se han encontrado activados.

#### IV.2.d.5. Análisis de la expresión génica para la validación de los resultados obtenidos mediante la estrategia SILAC

Con el fin de validar la desregulación observada en ciertas proteínas, se lleva a cabo un análisis de expresión génica. En concreto se seleccionan algunas de las proteínas que muestran una alteración más notable como CHERP, SHMT2, RFC3 y DDX3X. Tal y como se ha comentado anteriormente, estas proteínas suponen dianas importantes para el tratamiento contra el cáncer. Los resultados obtenidos (Figura IV.36) confirman la inhibición observada en el experimento SILAC tras el tratamiento con el nanosistema **MSNs-Tf-AgNPs** (Tabla IV-6). A modo general, y como se ha comentado anteriormente, dicha desregulación supone una reducción de la proliferación tumoral afectando al ciclo celular e incluso a la activación de la apoptosis.

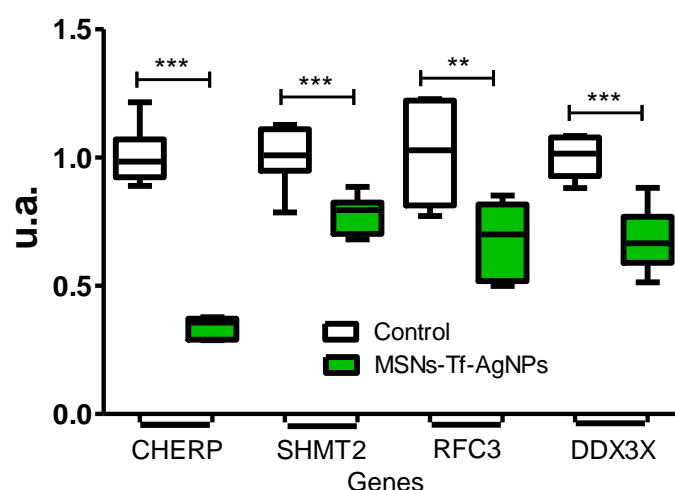


Figura IV.36. Niveles de  $ARN_m$  de los diferentes genes alterados: CHERP, SHMT2, RFC3 y DDX3X. Significación estadística al comparar con el control: \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$

En concreto, se ha demostrado que la inhibición de cualquiera de estas proteínas estudiadas en numerosos tipos de cáncer da lugar a un fallo en la síntesis y replicación del ADN que conlleva una parada del ciclo celular en la transición G1/S.<sup>300,302,312,314</sup> Este punto de restricción del ciclo celular se encuentra regulado por la acción de un complejo formado por la Ciclina E y la quinasa dependiente de Ciclina Cdk2, tal y como se ha comentado en el apartado IV.2.c.5 (véase Figura IV.21). Por ello, y con el fin de profundizar en este aspecto, se evalúan los niveles de  $ARN_m$  de ambas proteínas. Los resultados obtenidos (Figura IV.37) demuestran la

inhibición de dichas proteínas en los cultivos tratados con el nanosistema en comparación con los cultivos control. Este hecho respalda la reducción de la viabilidad de las células cancerígenas, observada en los ensayos previos (Figura IV.30), y supone un posible mecanismo de efectividad anti-tumoral del nanosistema mediante el bloqueo del ciclo celular en la transición G1/S.

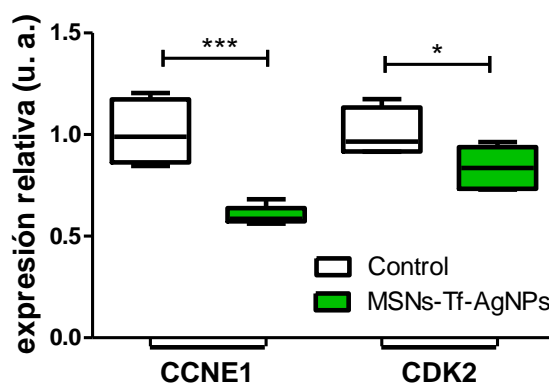


Figura IV.37. Niveles de de ARN<sub>m</sub> de las proteínas que forman el complejo regulador de la transición G1/S (Ciclina E y Cdk2). Significación estadística al comparar con el control: \*p<0.05 y \*\*\*p<0.001

Finalmente, tras el análisis de la expresión de algunas de las proteínas que se han encontrado con un R<sub>SILAC</sub> elevado, como SMCHD1 y PSPI1, se puede observar que los niveles de ARN<sub>m</sub> son inferiores en los cultivos tratados frente a los cultivos control (Figura IV.38), dato que, a priori, podría resultar contradictorio.

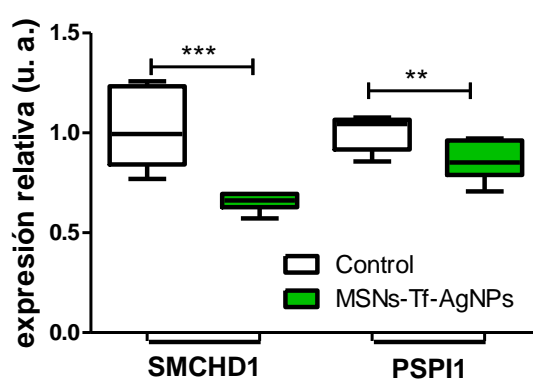


Figura IV.38. Niveles de de ARN<sub>m</sub> de las proteínas SMCHD1 y PSPI1. Significación estadística al comparar con el control: \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001

No obstante, tal y como se ha comentado anteriormente, las proteínas que codifican los genes evaluados se acumulan en el núcleo de las células que presentan daños en el ADN y activación de la señalización en respuesta a estrés celular.<sup>320,323,324</sup> Por ello, es lógico que en el análisis de expresión diferencial mediante la estrategia SILAC se hayan obtenido valores

elevados de  $R_{\text{SILAC}}$  para dichas proteínas en la fracción nuclear. Sin embargo, dado que el análisis de expresión génica se ha llevado a cabo en un lisado total, el hecho de que los datos sean opuestos, implica que los  $R_{\text{SILAC}}$  elevados no responden a una sobreexpresión de dichas proteínas, sino a una traslocación y, por tanto, una acumulación de éstas en el núcleo tras la exposición de las células a los nanosistemas.

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

---



Las conclusiones derivadas de la presente Tesis Doctoral pueden resumirse en los siguientes puntos:

- a) El desarrollo de diferentes nanosistemas basados en nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs) que incorporan plata ha permitido evaluar la capacidad bactericida de los mismos contra la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* con el fin de obtener nuevas terapias efectivas. Se ha demostrado la mayor efectividad para el material **MSNs-AgBrNPs**, el cual ocasiona alteraciones en la pared celular de la bacteria. Así, este material supone una base para nuevos candidatos a vacunas terapéuticas o tratamientos con la posibilidad de combinarse con otros fármacos que pueden alojarse en la estructura mesoporosa.
- b) La funcionalización de MSNs con proteínas inmunomoduladoras ha supuesto la obtención de los nanosistemas **MSNs-Ag85B**, **MSNs-LprG** y **MSNs-LprA**. Estos nanosistemas son capaces de activar el sistema inmune tal y como confirman los resultados del estudio *in vitro*, ya que se produce un aumento en la secreción de citoquinas tanto en la ruta proinflamatoria como en la antiinflamatoria. El desarrollo de estos nanosistemas efectivos puede suponer el origen de nuevas vacunas preventivas contra Mtb.
- c) El estudio citotóxico de las **TiO<sub>2</sub>-NPs** ha demostrado el potencial toxicológico de las mismas en fase anatasa frente a la fase rutilo, que presenta mayor biocompatibilidad a las concentraciones estudiadas. Se ha confirmado la reducción de la viabilidad dependiente de la concentración y del tiempo cuando las células son tratadas con la fase anatasa. Dicha reducción se ve acompañada de un aumento de la vacuolización de las células y de diversos cambios en la morfología celular. A su vez, se ha observado un arresto del ciclo celular y una acumulación de las células tratadas en las fases S-G2/M debido a una desregulación de proteínas clave en la regulación del mismo, tales como Cdk2, Ciclina A, Cdk1 y Ciclina B. Sin embargo, se ha demostrado que las **TiO<sub>2</sub>-NPs** no ocasionan alteraciones en el grado de muerte por apoptosis con respecto a un cultivo control. Los estudios de proteómica cuantitativa mediante marcaje isotópico (SILAC) han permitido identificar 1874 proteínas, de las cuales se han podido cuantificar 537. Se ha confirmado la desregulación de 69 de dichas proteínas debido al efecto de las **TiO<sub>2</sub>-NPs** observándose la alteración de procesos de endocitosis, respuesta a estrés, así como procesos de regulación del ciclo celular y la mitosis, que confirman los resultados comentados anteriormente. Además, el empleo de esta técnica para el análisis de proteínas de membrana ha permitido la

identificación de receptores de membrana alterados por el efecto de las nanopartículas como el EGFR, el cual es responsable de numerosas rutas de señalización.

- d) El estudio de diferentes rutas sintéticas para la obtención de nanosistemas híbridos proteína-Ag, basados en nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs), ha dado lugar a los materiales **MSNs-BSA-AgNPs**, como control, y **MSNs-Tf-AgNPs** como material para vectorización a células cancerígenas. La evaluación de la efectividad del material **MSNs-Tf-AgNPs** mediante técnicas bioanalíticas ha confirmado su elevada internalización selectiva en células cancerígenas frente al material control, así como la reducción de la viabilidad de las células enfermas debido al agente anti-tumoral (AgNPs). Los estudios de localización intracelular del nanosistema han permitido demostrar su internalización en lisosomas donde se produce la degradación de las AgNPs liberando iones  $\text{Ag}^+$ . Finalmente, en el estudio proteómico de la fracción nuclear mediante SILAC se han identificado 822 proteínas de las cuales se han cuantificado 451. La desregulación de 32 de dichas proteínas por el tratamiento con el nanosistema desarrollado ha demostrado la inhibición de algunos de los mecanismos que favorecen el crecimiento de las células cancerígenas, explicando así la reducción de viabilidad observada. Algunos de estos mecanismos participan en rutas de señalización que afectan al ciclo celular y la síntesis de ADN o a la capacidad de invasión y la metástasis. Estos resultados junto con la validación realizada mediante RT-qPCR, ofrecen las bases de un potencial nanosistema para terapia anti-tumoral.

# **CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---





1. Rivas, J. & Sorg, C. ESF Scientific Forward Look on Nanomedicine. *Eur. Sci. Found. Policy Brief.* **23**, 1–6 (2015).
2. Duncan, R. & Gaspar, R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol. Pharm.* **8**, 2101–2141 (2011).
3. Peer, D. *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 751–760 (2007).
4. Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V. & Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J. Control. Release* **200**, 138–157 (2015).
5. Huang, Y.-W., Cambre, M. & Lee, H.-J. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2702 (2017).
6. Powers, K. W., Palazuelos, M., Moudgil, B. M. & Roberts, S. M. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology* **1**, 42–51 (2007).
7. Shin, S. W., Song, I. H. & Um, S. H. Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity. *Nanomaterials* **5**, 1351–1365 (2015).
8. Albanese, A., Tang, P. S. & Chan, W. C. W. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu.Rev.Biomed.Eng.* **14**, 1–16 (2012).
9. Oberdörster, G., Oberdörster, E. & Oberdörster, J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* **113**, 823–839 (2005).
10. Colilla, M. *Chapter 5: Silica-Based Ceramics: Mesoporous Silica. In Bio-Ceramics with Clinical Applications.* (John Wiley & Sons, 2014).
11. Avnir, D., Coradin, T., Lev, O. & Livage, J. Recent bio-applications of sol–gel materials. *J. Mater. Chem.* **16**, 1013–1030 (2006).
12. Tan, W. *et al.* Bionanotechnology based on silica nanoparticles. *Med. Res. Rev.* **24**, 621–638 (2004).
13. Barbé, C. *et al.* Silica particles: A novel drug-delivery system. *Adv. Mater.* **16**, 1959–1966 (2004).
14. Colilla, M., González, B. & Vallet-Regí, M. Mesoporous silicananoparticles for the design of smart delivery nanodevices. *Biomater. Sci.* **1**, 114–134 (2013).
15. Lu, J., Liong, M., Zink, J. I. & Tamanoi, F. Mesoporous silica nanoparticles as a delivery

- system for hydrophobic anticancer drugs. *Small* **3**, 1341–1346 (2007).
16. Hudson, S., Padera, R. F., Langer, R. & Kohane, D. S. The biocompatibility of mesoporous silicates. *Biomaterials* **29**, 4045–4055 (2008).
  17. Thomas, C. R. *et al.* Noninvasive remote-controlled release of drug molecules in vitro using magnetic actuation of mechanized nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 10623–10625 (2010).
  18. Meng, H. *et al.* Engineered Design of Mesoporous Silica Nanoparticles to Deliver Doxorubicin and Pgp siRNA to Overcome Drug Resistance in a Cancer Cell Line. *ACS Nano* **4**, 4539–4550 (2010).
  19. Wu, S.-H., Hung, Y. & Mou, C.-Y. Mesoporous silica nanoparticles as nanocarriers. *Chem. Commun.* **47**, 9972 (2011).
  20. Vivero-escoto, J. L. *et al.* Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Controlled Drug Delivery. 1952–1967 (2010). doi:10.1002/sml.200901789
  21. Jaganathana, H. & Godin, B. Biocompatibility Assessment of Si-based Nano- and Micro-particles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 1800–1819 (2012).
  22. Rosenholm, J. M., Mamaeva, V., Sahlgren, C. & Lindén, M. Nanoparticles in Targeted Cancer Therapy Mesoporous Silica Nanoparticles Entering Preclinical Development Stage. *Nanomedicine* **7**, 111–120. (2012).
  23. Benezra, M. *et al.* Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *J. Clin. Invest.* **121**, 2768–2780 (2011).
  24. Lu, J., Liong, M., Li, Z., Zink, J. I. & Tamanoi, F. Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer herapy in Animals. *Small* **6**, 1794–1805 (2010).
  25. Zhao, Y. *et al.* Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: Size and surface effects. *ACS Nano* **5**, 1366–1375 (2011).
  26. Vallet-Regi, M., Rámila, A., Del Real, R. P. & Pérez-Pariente, J. A new property of MCM-41: Drug delivery system. *Chem. Mater.* **13**, 308–311 (2001).
  27. Singh, R. K., Patel, K. D., Leong, K. W. & Kim, H. W. Progress in Nanotheranostics Based on Mesoporous Silica Nanomaterial Platforms. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 10309–10337 (2017).
  28. Ferrari, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 161–171 (2005).

29. Fan, Z., Fu, P. P., Yu, H. & Ray, P. C. Theranostic nanomedicine for cancer detection and treatment. *J. Food Drug Anal.* **22**, 3–17 (2014).
30. Liong, M. *et al.* Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. *ACS Nano* **2** VN-re, 889–896 (2008).
31. Ahmed, N., Fessi, H. & Elaissari, A. Theranostic applications of nanoparticles in cancer. *Drug Discov. Today* **17**, 928–934 (2012).
32. WHO. *Global Tuberculosis Report 2017*. Who (2017). doi:WHO/HTM/TB/2017.23
33. Delogu, G., Sali, M. & Fadda, G. The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **5**, (2013).
34. Luca, S. & Mihaescu, T. History of BCG Vaccine. *Maedica A J. Clin. Med.* **8**, 53–8 (2013).
35. Churchyard, G. *et al.* What We Know about Tuberculosis Transmission: An Overview. *J. Infect. Dis.* **216**, S629–S635 (2017).
36. Kenneth, J. R. & Ray, C. G. *Sherris Medical Microbiology*. McGraw Hill (2004).
37. Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A. B., Netea, M. G. & Van Crevel, R. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, 1–12 (2011).
38. Forrellad, M. A. *et al.* Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence* **4**, 3–66 (2013).
39. Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R. & Casadevall, A. Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 620–630 (2015).
40. Brennan, P. . Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis* **83**, 91–97 (2003).
41. Fukuda, T. *et al.* Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. *MBio* **4**, 8–10 (2013).
42. Jones-López, E. C. *et al.* Cough aerosols of Mycobacterium tuberculosis predict new infection: A household contact study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 1007–1015 (2013).
43. Monina, L. & Khader, S. A. Chemokines in tuberculosis: The good, the bad and the ugly. *Semin. Immunol.* **26**, 552–558 (2014).
44. Matucci, A., Maggi, E. & Vultaggio, A. Cellular and humoral immune responses during tuberculosis infection: Useful knowledge in the era of biological agents. *J. Rheumatol.* **41**,

- 17–23 (2014).
45. Saraav, I., Singh, S. & Sharma, S. Outcome of Mycobacterium tuberculosis and Toll-like receptor interaction: Immune response or immune evasion? *Immunol. Cell Biol.* **92**, 741–746 (2014).
  46. Behar, S. *et al.* Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal Immunol* **4**, 279–287 (2011).
  47. Ahmad, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, (2011).
  48. Kozakiewicz, L., Phuah, J., Flynn, J. & Chan, J. The Role of B Cells and Humoral Immunity in Mycobacterium tuberculosis Infection. *New Paradig. Immun. to Tuberc. Adv. Exp. Med. Biol.* **783**, 225–250 (2013).
  49. Madan-Lala, R. *et al.* Mycobacterium tuberculosis impairs dendritic cell functions through the serine hydrolase Hip1. *J. Immunol.* **192**, 4263–4272 (2014).
  50. Morris, D. *et al.* Characterization of dendritic cell and regulatory T-cell functions against Mycobacterium tuberculosis infection. *Biomed Res. Int.* **2013**, 14 pages (2013).
  51. Kaufmann, S. H. E. Tuberculosis vaccines: Time to think about the next generation. *Semin. Immunol.* **25**, 172–181 (2013).
  52. Gopal, R. *et al.* Unexpected Role for IL-17 in Protective Immunity against Hypervirulent Mycobacterium tuberculosis HN878 Infection. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
  53. Andersen, P. & Woodworth, J. S. Tuberculosis vaccines - rethinking the current paradigm. *Trends Immunol.* **35**, 387–395 (2014).
  54. Fabri, M. *et al.* Vitamin D Is Required for IFN- $\gamma$ -Mediated Antimicrobial Activity of Human Macrophages. *Sci. Transl. Med.* **3**, (2012).
  55. Damtie, D., Woldeyohannes, D. & Mathewos, B. Review on Molecular Mechanism of First Line Antibiotic Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Mycobact. Dis.* **4**, 4–7 (2014).
  56. Gilman, A. & Goodman, L. S. *The Pharmacological Basis of Therapeutics. Journal of Chemical Information and Modeling* **53**, (2011).
  57. Zhang, Y. & Yew, W.-W. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: update 2015. *Int. J. Tuberc. lung Dis.* **t 19**, 1276–89 (2015).
  58. Lorenzo, D. & Mousa, S. A. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis and current status of rapid molecular diagnostic testing. *Acta Trop.* **119**, 5–10 (2011).

59. Ismail, S., Maikudi Usman, M. & Chong Teoh, T. Vaccine research and development: tuberculosis as a global health threat. *Cent. Eur. J. Immunol. Eur J Immunol* **42**, (2017).
60. da Costa, A. C., Nogueira, S. V., Kipnis, A. & Junqueira-Kipnis, A. P. Recombinant BCG: Innovations on an old vaccine. Scope of BCG strains and strategies to improve long-lasting memory. *Front. Immunol.* **5**, 1–9 (2014).
61. Norouzi, S. *et al.* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) complications associated with primary immunodeficiency diseases. *J. Infect.* **64**, 543–554 (2012).
62. Poyntz, H. C. *et al.* Non-tuberculous mycobacteria have diverse effects on BCG efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **94**, 226–237 (2014).
63. Horwitz, M. A. & Harth, G. A New Vaccine against Tuberculosis Affords Greater Survival after Challenge than the Current Vaccine in the Guinea Pig Model of Pulmonary Tuberculosis A New Vaccine against Tuberculosis Affords Greater Survival after Challenge than the Current Vaccine in. *Infect. Immun.* **71**, 1672–1679 (2003).
64. Horwitz, M. a, Harth, G., Dillon, B. J. & Maslesa-Galic, S. Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *PNAS* **97**, 13853–13858 (2000).
65. Principi, N. & Esposito, S. The present and future of tuberculosis vaccinations. *Tuberculosis* **95**, 6–13 (2015).
66. Yu, D. H., Hu, X. D. & Cai, H. Efficient tuberculosis treatment in mice using chemotherapy and immunotherapy with the combined DNA vaccine encoding Ag85B, MPT-64 and MPT-83. *Gene Ther.* **15**, 652–659 (2008).
67. Andersen, P. TB vaccines: Progress and problems. *Trends Immunol.* **22**, 160–168 (2001).
68. McShane, H. *et al.* Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat. Med.* **10**, 1240–1244 (2004).
69. Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N. & Friede, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* **30**, 23–32 (2009).
70. Ottenhoff, T. H. M. *et al.* First in humans: A new molecularly defined vaccine shows excellent safety and strong induction of long-lived *Mycobacterium tuberculosis*-specific Th1-cell like responses. *Hum. Vaccin.* **6**, 1007–1015 (2010).
71. Ismail, S., Maikudi Usman, M. & Chong Teoh, T. Vaccine research and development:

- tuberculosis as a global health threat. *Cent. Eur. J. Immunol. Eur J Immunol* **42**, 196–204 (2017).
72. Ruiz Manzano, J. & Vilaplana, C. Will We Be Treating Tuberculosis with Vaccines in the xxi Century? *Arch Bronconeumol* **50**, 373–374 (2014).
  73. Cardona, P. J. RUTI: A new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis* **86**, 273–289 (2006).
  74. Nunes-Alves, C. *et al.* In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 289–299 (2014).
  75. Kaufmann, S. H. E. Future vaccination strategies against tuberculosis: Thinking outside the Box. *Immunity* **33**, 567–577 (2010).
  76. Prados-Rosales, R. *et al.* Role for mycobacterium tuberculosis membrane vesicles in iron acquisition. *J. Bacteriol.* **196**, 1250–1256 (2014).
  77. Majlessi, L., Prados-Rosales, R., Casadevall, A. & Brosch, R. Release of mycobacterial antigens. *Immunol. Rev.* **264**, 25–45 (2015).
  78. Rath, P. *et al.* Genetic regulation of vesiculogenesis and immunomodulation in Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E4790-7 (2013).
  79. Prados-Rosales, R., Carreño, L. J. & Batista-Gonzalez, A. Mycobacterial Membrane Vesicles Administered Systemically in Mice Induce a Protective Immune Response to Surface Compartments of Mycobacterium tuberculosis. *MBio* **5**, (2014).
  80. Prados-rosales, R. *et al.* Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 1471–1483 (2011).
  81. Deatherage, B. L. *et al.* Biogenesis of Bacterial Membrane Vesicles. **72**, 1395–1407 (2010).
  82. Kuehn, M. J. & Kesty, N. C. Bacterial outer membrane vesicles and the host – pathogen interaction. *Genes Dev.* 2645–2655 (2005).
  83. Beveridge, T. J. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725–4733 (1999).
  84. Gehring, A. J., Dobos, K. M., Belisle, J. T., Harding, C. V. & Boom, W. H. Mycobacterium tuberculosis LprG (Rv1411c): A Novel TLR-2 Ligand That Inhibits Human Macrophage Class II MHC Antigen Processing. *J. Immunol.* **173**, 2660–2668 (2004).
  85. Brightbill, H. D. *et al.* Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins

- through toll-like receptors. *Science* **285**, 732–736 (1999).
86. Pecora, N. D., Gehring, A. J., Canaday, D. H., Boom, W. H. & Harding, C. V. Mycobacterium tuberculosis LprA Is a Lipoprotein Agonist of TLR2 That Regulates Innate Immunity and APC Function. *J. Immunol.* **177**, 422–429 (2006).
  87. Beatty, W. L. *et al.* Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic* **1**, 235–247 (2000).
  88. Mamo, T. & Poland, G. A. Nanovaccinology: The next generation of vaccines meets 21st century materials science and engineering. *Vaccine* **30**, 6609–6611 (2012).
  89. Zhao, L. *et al.* Nanoparticle vaccines. *Vaccine* **32**, 327–37 (2014).
  90. Babensee, J. E. Interaction of dendritic cells with biomaterials. *Semin. Immunol.* **20**, 101–108 (2008).
  91. Jones, K. S. Biomaterials as vaccine adjuvants. *Biotechnol. Prog.* **24**, 807–814 (2008).
  92. Bachmann, M. F. & Jennings, G. T. Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 787–796 (2010).
  93. Kumari, A. & Yadav, S. K. Cellular interactions of therapeutically delivered nanoparticles. *Expert Opin. Drug Deliv.* **8**, 141–151 (2011).
  94. Zolnik, B. S., González-Fernández, Á., Sadrieh, N. & Dobrovolskaia, M. A. Minireview: Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology* **151**, 458–465 (2010).
  95. Dobrovolskaia, M. a, Aggarwal, P., Hall, J. B. & Mcneil, S. E. Preclinical studies to understand NP interaction with the immune system and its potential effects on NP biodistribution. *Mol. Pharm.* **5**, 487–495 (2009).
  96. Xiang, S. D. *et al.* Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods* **40**, 1–9 (2006).
  97. Foged, C., Brodin, B., Frokjaer, S. & Sundblad, A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int. J. Pharm.* **298**, 315–322 (2005).
  98. Hillaireau, H. & Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2873–2896 (2009).
  99. Raghuvanshi, R. S. *et al.* Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *Int. J. Pharm.* **245**, 109–121 (2002).
  100. Thomann-Harwood, L. J. *et al.* Nanogel vaccines targeting dendritic cells: Contributions



- of the surface decoration and vaccine cargo on cell targeting and activation. *J. Control. Release* **166**, 95–105 (2013).
101. Mahony, D. *et al.* Mesoporous Silica Nanoparticles Act as a Self-Adjuvant for Ovalbumin Model Antigen in Mice. *Small* **9**, 3138–3146 (2013).
  102. Mody, K. T. *et al.* Mesoporous silica nanoparticles as antigen carriers and adjuvants for vaccine delivery. *Nanoscale* **5**, 5167–79 (2013).
  103. Vallhov, H. *et al.* Adjuvant properties of mesoporous silica particles tune the development of effector T cells. *Small* **8**, 2116–2124 (2012).
  104. Carvalho, L. V. *et al.* Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. *Vaccine* **28**, 7829–7836 (2010).
  105. Kupferschmidt, N. *et al.* Mesoporous silica particles potentiate antigen-specific T-cell responses. *Nanomedicine* **9**, 1835–1846 (2014).
  106. Daffé, M. The mycobacterial antigens 85 complex – from structure to function and beyond. *Trends Microbiol.* 438–440 (2000).
  107. Wiker, H. G. & Harboe, M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.* **56**, 648–661 (1992).
  108. Palma, C. *et al.* The Ag85B protein of *Mycobacterium tuberculosis* may turn a protective immune response induced by Ag85B-DNA vaccine into a potent but non-protective Th 1 immune response in mice. **9**, 1455–1465 (2007).
  109. Becker, K. & Sander, P. *Mycobacterium tuberculosis* lipoproteins in virulence and immunity – fighting with a double-edged sword. *FEBS Lett.* **590**, 3800–3819 (2016).
  110. Rai, M., Yadav, A. & Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* **27**, 76–83 (2009).
  111. Marambio-Jones, C. & Hoek, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanoparticle Res.* **12**, 1531–1551 (2010).
  112. Xiu, Z. M., Zhang, Q. B., Puppala, H. L., Colvin, V. L. & Alvarez, P. J. J. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Lett.* **12**, 4271–4275 (2012).
  113. Cui, L. *et al.* In situ study of the antibacterial activity and mechanism of action of silver nanoparticles by surface-enhanced raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **85**, 5436–5443 (2013).
  114. Lara, H. H., Ayala-Núñez, N. V., Ixtapan Turrent, L. del C. & Rodríguez Padilla, C.

- Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 615–621 (2010).
115. Li, W.-R. *et al.* Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *BioMetals* **24**, 135–141 (2011).
116. Morones, J. R. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16**, 2346–2353 (2005).
117. Li, X., Lenhart, J. J. & Walker, H. W. Dissolution-accompanied aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Langmuir* **26**, 16690–16698 (2010).
118. Kvítek, L. *et al.* Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *J. Phys. Chem. C* **112**, 5825–5834 (2008).
119. Castanon, J. I. R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult. Sci.* **86**, 2466–2471 (2007).
120. Khurana, C., Vala, A. K., Andhariya, N., Pandey, O. P. & Chudasama, B. Antibacterial activity of silver: The role of hydrodynamic particle size at nanoscale. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **102**, 3361–3368 (2014).
121. Lok, C.-N. *et al.* Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **12**, 527–534 (2007).
122. Sotiriou, G. A. & Pratsinis, S. E. Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 5649–5654 (2010).
123. Suchomel, P. *et al.* Comparative Study of Antimicrobial Activity of AgBr and Ag Nanoparticles (NPs). *PLoS One* **10**, 1–15 (2015).
124. Tian, Y. *et al.* Facile, One-Pot Synthesis, and Antibacterial Activity of Mesoporous Silica Nanoparticles Decorated with Well-Dispersed Silver Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 12038–12045 (2014).
125. Saint-Cricq, P., Wang, J., Sugawara-Narutaki, A., Shimojima, A. & Okubo, T. A new synthesis of well-dispersed, core-shell Ag@SiO<sub>2</sub> mesoporous nanoparticles using amino acids and sugars. *J. Mater. Chem. B* **1**, 2451 (2013).
126. Li, Y. *et al.* Preparation of AgBr@SiO<sub>2</sub> core@shell hybrid nanoparticles and their bactericidal activity. *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 1808–1812 (2013).
127. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, W. P. World cancer Report 2014. (2014). doi:10.3945/an.116.012211
128. International Agency for Research on Cancer, W. H. O. Latest world cancer statistics

- Global cancer burden rises to 14 . 1 million new cases in 2012 : Marked increase in breast cancers must be addressed. (2013). at <[http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223\\_E.pdf](http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf)>
129. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
  130. Iwamoto, T. Clinical Application of Drug Delivery Systems in Cancer Chemotherapy : Review of the Efficacy and Side Effects of Approved Drugs. *Biol. Pharm. Bulliten* **36**, 715–718 (2013).
  131. Chabner, B. A. & Roberts, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 65–72 (2005).
  132. Jenkins, V. *et al.* Patients' and oncologists' views on the treatment and care of advanced ovarian cancer in the UK: Results from the ADVOCATE study. *Br. J. Cancer* **108**, 2264–2271 (2013).
  133. Villela-Martinez, L. M., Velez-Ayala, A. K., Lopez-Sanchez, R. del C., Martinez-Cardona, J. A. & Hernandez-Hernandez, J. A. Advantages of drug selective distribution in cancer treatment: Brentuximab vedotin. *Int. J. Pharmacol.* **13**, 785–807 (2017).
  134. Kenneth D. Tew and Paul B. Fisher. *Advances in Cancer Research*. (Elsevier, 2013).
  135. Maranhão, R. C., Vital, C. G., Tavoni, T. M. & Graziani, S. R. Clinical experience with drug delivery systems as tools to decrease the toxicity of anticancer chemotherapeutic agents. *Expert Opin. Drug Deliv.* **14**, 1217–1226 (2017).
  136. Wang, X., Yang, L., Chen, Z. & Shin, D. M. Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging. *CA. Cancer J. Clin.* **58**, 97–110 (2008).
  137. Liu, Y., Miyoshi, H. & Nakamura, M. Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *Int. J. Cancer* **120**, 2527–2537 (2007).
  138. Bregoli, L. *et al.* Nanomedicine applied to translational oncology: A future perspective on cancer treatment. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12**, 81–103 (2016).
  139. Srinivasan, M., Rajabi, M. & Mousa, S. Multifunctional Nanomaterials and Their Applications in Drug Delivery and Cancer Therapy. *Nanomaterials* **5**, 1690–1703 (2015).
  140. Scheinberg, D. A., Villa, C. H., Escorcía, F. E. & McDevitt, M. R. Conscripts of the infinite armada: Systemic cancer therapy using nanomaterials. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 266–276 (2010).

141. Ferrari, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 161–171 (2005).
142. Zhang, X. Q. *et al.* Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 1363–1384 (2012).
143. Minchinton, A. I. & Tannock, I. F. Drug penetration in solid tumours. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 583–592 (2006).
144. Matsumura, Y. & Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agents Smancs. *Cancer Res.* **46**, 6387–6392 (1986).
145. Martínez-Carmona, M., Colilla, M. & Vallet-Regí, M. Smart Mesoporous Nanomaterials for Antitumor Therapy. *Nanomaterials* **5**, 1906–1937 (2015).
146. Hobbs, S. K. *et al.* Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 4607–4612 (1998).
147. Elnakat, H. & Ratnam, M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: Implications in targeted therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1067–1084 (2004).
148. Detampel, P., Witzigmann, D., Krähenbühl, S. & Huwyler, J. Hepatocyte targeting using pegylated asialofetuin-conjugated liposomes. *J. Drug Target.* **22**, 232–241 (2014).
149. van Furth, R. *et al.* The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.* **46**, 845–852 (1972).
150. Bareford, L. M. & Swaan, P. W. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 748–758 (2007).
151. Xu, S., Olenyuk, B. Z., Okamoto, C. T. & Hamm-Alvarez, S. F. Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: rationale and advances. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 121–138 (2013).
152. Bogdan, J., Pławińska-Czarnak, J. & Zarzyńska, J. Nanoparticles of Titanium and Zinc Oxides as Novel Agents in Tumor Treatment: a Review. *Nanoscale Res. Lett.* **12**, (2017).
153. Fei Yin, Z., Wu, L., Gui Yang, H. & Hua Su, Y. Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 4844 (2013).
154. Rehman, F. U., Zhao, C., Jiang, H. & Wang, X. Biomedical applications of nano-titania in theranostics and photodynamic therapy. *Biomater. Sci.* **4**, 40–54 (2016).

155. Shi, H., Magaye, R., Castranova, V. & Zhao, J. Titanium dioxide nanoparticles : A review of current toxicological data. *Part. Fibre Toxicol.* **10**, 15 (2013).
156. Iavicoli, I., Leso, V. & Bergamaschi, A. Toxicological Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles: A Review of In Vivo Studies. *J. Nanomater.* **2012**, 1–36 (2012).
157. Iavicoli, I., Leso, V., Fontana, L. & Bergamaschi, A. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **15**, 481–508 (2011).
158. Hanot-Roy, M. *et al.* Oxidative stress pathways involved in cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on cells constitutive of alveolo-capillary barrier in vitro. *Toxicol. Vitro.* **33**, 125–135 (2016).
159. Chalovich, J. M. & Eisenberg, E. Titanium dioxide nanoparticles increase inflammatory responses in vascular endothelial cells. *Biophys. Chem.* **257**, 2432–2437 (2005).
160. Saquib, Q. *et al.* Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicol. Vitro.* **26**, 351–61 (2012).
161. Patel, S., Patel, P. & Bakshi, S. R. Titanium dioxide nanoparticles: an in vitro study of DNA binding, chromosome aberration assay, and comet assay. *Cytotechnology* **69**, 245–263 (2017).
162. Jain, A. K. *et al.* Impact of anatase titanium dioxide nanoparticles on mutagenic and genotoxic response in Chinese hamster lung fibroblast cells (V-79): The role of cellular uptake. *Food Chem. Toxicol.* **105**, 127–139 (2017).
163. Wei, L. *et al.* Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discov. Today* **20**, 595–601 (2015).
164. Ong, C. *et al.* Silver nanoparticles in cancer: therapeutic efficacy and toxicity. *Curr. Med. Chem.* **20**, 772–81 (2013).
165. Vlăsceanu, G. M. *et al.* in *Nanobiomaterials in Cancer Therapy* 29–56 (2016). doi:10.1016/B978-0-323-42863-7.00002-5
166. Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W. & Gurunathan, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1534 (2016).
167. Sheikpranbabu, S. *et al.* Silver nanoparticles inhibit VEGF-and IL-1??-induced vascular permeability via Src dependent pathway in porcine retinal endothelial cells. *J. Nanobiotechnology* **7**, 8 (2009).

168. Kemp, M. M. *et al.* Gold and silver nanoparticles conjugated with heparin derivative possess anti-angiogenesis properties. *Nanotechnology* **20**, (2009).
169. Gurunathan, S. *et al.* Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials* **30**, 6341–6350 (2009).
170. Kalishwaralal, K. *et al.* Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **73**, 51–57 (2009).
171. Nallathamby, P. D. & Xu, X.-H. N. Study of Cytotoxic and Therapeutic Effects of Stable and Purified Silver Nanoparticles on Tumor Cells. *Nanoscale* **2**, 942–952 (2010).
172. Woods, S. J., Hannan, K. M., Pearson, R. B. & Hannan, R. D. The nucleolus as a fundamental regulator of the p53 response and a new target for cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1849**, 821–829 (2015).
173. Wu, P., Gao, Y., Lu, Y., Zhang, H. & Cai, C. High specific detection and near-infrared photothermal therapy of lung cancer cells with high SERS active aptamer–silver–gold shell–core nanostructures. *Analyst* **138**, 6501 (2013).
174. Chen, M., Zhang, L., Gao, M. & Zhang, X. High-sensitive bioorthogonal SERS tag for live cancer cell imaging by self-assembling core-satellites structure gold-silver nanocomposite. *Talanta* **172**, 176–181 (2017).
175. Tang, L., Dong, C. & Ren, J. Highly sensitive homogenous immunoassay of cancer biomarker using silver nanoparticles enhanced fluorescence correlation spectroscopy. *Talanta* **81**, 1560–1567 (2010).
176. AshaRani, P. V., Mun, G. L. K., Hande, M. P. & Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanomaterials. *ACS Nano* **3**, 279–290 (2009).
177. Singh, S. P., Bhargava, D. C. S., Dubey, D. V., Mishra, A. & Singh, Y. Silver nanoparticles : Biomedical applications , toxicity , and safety issues. *Int. J. Res. Pharm. Pharm. Sci.* **2**, 01–10 (2017).
178. McShan, D., Ray, P. C. & Yu, H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J. Food Drug Anal.* **22**, 116–127 (2014).
179. AshaRani, P., Hande, M. P. & Valiyaveetil, S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol.* **10**, 65 (2009).
180. Tang, F. *et al.* The Practicality of Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Devices and Progress Toward This Goal. *Nano Today* **46**, 1278–1288 (2013).

181. Davis, M. E., Chen, Z. & Shin, D. M. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 771–782 (2008).
182. Cauda, V., Argyo, C. & Bein, T. Impact of different PEGylation patterns on the long-term bio-stability of colloidal mesoporous silica nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **20**, 8693 (2010).
183. López, V. *et al.* Janus Mesoporous Silica Nanoparticles for Dual Targeting of Tumor Cells and Mitochondria. (2017). doi:10.1021/acsami.7b06906
184. Jadhav, S. A., Miletto, I., Brunella, V., Berlier, G. & Scalarone, D. Controlled post-synthesis grafting of thermoresponsive poly( *N* -isopropylacrylamide) on mesoporous silica nanoparticles. *Polym. Adv. Technol.* **26**, 1070–1075 (2015).
185. Baeza, A., Guisasola, E., Ruiz-Hernández, E. & Vallet-Regí, M. Magnetically triggered multidrug release by hybrid mesoporous silica nanoparticles. *Chem. Mater.* **24**, 517–524 (2012).
186. Ruiz-Hernández, E., Baeza, A. & Vallet-Regí, M. Smart drug delivery through DNA/magnetic nanoparticle gates. *ACS Nano* **5**, 1259–1266 (2011).
187. Paris, J. L. *et al.* Vectorization of ultrasound-responsive nanoparticles in placental mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Nanoscale* **9**, 5528–5537 (2017).
188. Yang, X. *et al.* Near-infrared light-triggered, targeted drug delivery to cancer cells by aptamer gated nanovehicles. *Adv. Mater.* **24**, 2890–2895 (2012).
189. Gisbert-Garzarán, M., Lozano, D., Vallet-Regí, M. & Manzano, M. Self-immolative polymers as novel pH-responsive gate keepers for drug delivery. *RSC Adv.* **7**, 132–136 (2017).
190. Feng, W. *et al.* Polyelectrolyte multilayer functionalized mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive drug delivery: layer thickness-dependent release profiles and biocompatibility. *J. Mater. Chem. B* **1**, 5886 (2013).
191. Yang, K.-N. *et al.* pH-responsive mesoporous silica nanoparticles employed in controlled drug delivery systems for cancer treatment. *Cancer Biol. Med.* **11**, 34–43 (2014).
192. Zhang, J., Niemelä, M., Westermarck, J. & Rosenholm, J. M. Mesoporous silica nanoparticles with redox-responsive surface linkers for charge-reversible loading and release of short oligonucleotides. *Dalt. Trans.* **43**, 4115 (2014).
193. Baeza, A. *et al.* Hybrid enzyme-polymeric capsules/mesoporous silica nanodevice for in situ cytotoxic agent generation. *Adv. Funct. Mater.* **24**, 4625–4633 (2014).



194. Sanz-Ortiz, M. N., Sentosun, K., Bals, S. & Liz-Marzán, L. M. Templated Growth of Surface Enhanced Raman Scattering-Active Branched Gold Nanoparticles within Radial Mesoporous Silica Shells. *ACS Nano* **9**, 10489–10497 (2015).
195. Grün, M., Lauer, I. & Unger, K. K. The synthesis of micrometer- and submicrometer-size spheres of ordered mesoporous oxide MCM-41. *Adv. Mater.* **9**, 254–257 (1997).
196. Carcouët, C. C. M. C. *et al.* Nucleation and growth of monodisperse silica nanoparticles. *Nano Lett.* **14**, 1433–1438 (2014).
197. Manzano, M. *et al.* Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: Effect of particle morphology and amine functionalization. *Chem. Eng. J.* **137**, 30–37 (2008).
198. Liu, S., Lu, L., Yang, Z., Cool, P. & Vansant, E. F. Further investigations on the modified Stöber method for spherical MCM-41. *Mater. Chem. Phys.* **97**, 203–206 (2006).
199. Yano, K. & Fukushima, Y. Particle size control of mono-dispersed super-microporous silica spheres Electronic supplementary information (ESI) available: Comparison of the nitrogen and argon adsorption isotherms of De5 and scanning electron micrographs of calcined samples synthesise. *J. Mater. Chem.* **13**, 2577 (2003).
200. Si-Han Wu, a C.-Y. M. and H.-P. L. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. *Chem Soc Rev* **42**, (2013).
201. Beck, J. S. *et al.* A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10834–10843 (1992).
202. Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C. & Beck, J. S. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* **359**, 710–712 (1992).
203. Ying, J. Y.; Mehnert, C. P.; Wong, M. S. Synthesis and Applications of Supramolecular-Templated Mesoporous Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 56–77 (1999).
204. Firouzi, A. *et al.* Cooperative organization of inorganic-surfactant and biomimetic assemblies. *Science (80-. ).* **267**, 1138–1143 (1995).
205. Beck, J. S. *et al.* Molecular Or Supramolecular Templating: Defining The Role of Surfactant Chemistry In the Formation of M41S and Zeolitic Molecular Sieves. *Stud. Surf. Sci. Catal.* **98**, 15–16 (1995).
206. Monnier, A. *et al.* Cooperative Formation of Inorganic-Organic Interfaces in the Synthesis of Silicate Mesostructures. *Science (80-. ).* **261**, 1299–1303 (1993).
207. Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J. & Fröba, M. Silica-based mesoporous organic-



- inorganic hybrid materials. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **45**, 3216–3251 (2006).
208. Nieto, A., Balas, F. & Vallet-regi, M. Surface Electrochemistry of Mesoporous Silicas as a Key Factor in the Design of Tailored Delivery Devices. **26**, 5038–5049 (2010).
209. Rosenholm, J. M., Sahlgren, C. & Lindén, M. Towards multifunctional, targeted drug delivery systems using mesoporous silica nanoparticles – opportunities & challenges. *Nanoscale* **2**, 1870 (2010).
210. Zhuravlev, L. T. The surface chemistry of amorphous silica . Zhuravlev model. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **173**, 1–38 (2000).
211. De Juan, F. & Ruiz-Hitzky, E. Selective functionalization of mesoporous silica. *Adv. Mater.* **12**, 430–432 (2000).
212. Luo, Z. *et al.* Surface functionalized mesoporous silica nanoparticles with natural proteins for reduced immunotoxicity. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 1–14 (2013).
213. <https://web.expasy.org/protparam/>. (2015).
214. González, B. *et al.* Mesoporous silica nanoparticles decorated with polycationic dendrimers for infection treatment. *Acta Biomater.* **68**, 261–271 (2018).
215. Beckmann, N. *Carbon-13 NMR Spectroscopy of Biological Systems*. (Academic Press, 1995).
216. Qiu, F., Jiang, Y., Zhou, Y. & Liu, J. Synthesis, characterization and thermal properties of novel PMDA-PAPD/silica hybrid network polymers. *Silicon Chem.* **3**, 65–73 (2006).
217. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
218. Rodríguez-Galván, A., Contreras-Torres, F. F., Basiuk, E. V, Heredia, A. & Basiuk, V. a. Deposition of silver nanoparticles onto human serum albumin-functionalised multi-walled carbon nanotubes. *Can. J. Chem. Eng.* **91**, 264–270 (2013).
219. Goli, K. K. *et al.* Generation and properties of antibacterial coatings based on electrostatic attachment of silver nanoparticles to protein-coated polypropylene fibers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 5298–5306 (2013).
220. Serjeant, E. P., Dempsey, B. & Perrin, D. D. *pKa Prediction for Organic Acids and Bases*. (Springer, 1981).
221. Sun, R. W.-Y. *et at.* Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. *Chem. Commun.* **37**, 5059 (2005).

222. Chen, R. *et al.* Fabrication of gold nanoparticles with different morphologies in HEPES buffer. *Rare Met.* **29**, 180–186 (2010).
223. Tan, S., Erol, M., Attygalle, A., Du, H. & Sukhishvili, S. Synthesis of Positively Charged Silver Nanoparticles via Photoreduction of AgNO<sub>3</sub> in Branched Polyethyleneimine / HEPES Solutions. *Langmuir* **23**, 9836–9843 (2007).
224. Boukamp, P. *et al.* Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized. *J. Cell Biol.* **106**, 761–771 (1988).
225. Feng, Q. L. *et al.* A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *J. Biomed. Mater. Res.* **52**, 662–668 (2000).
226. Levak, M. *et al.* Effect of Protein Corona on Silver Nanoparticle Stabilization and Ion Release Kinetics in Artificial Seawater. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 1259–1266 (2017).
227. Juling, S. *et al.* Protein Corona Analysis of Silver Nanoparticles Links to Their Cellular Effects. *J. Proteome Res.* **16**, 4020–4034 (2017).
228. Lu, D. *et al.* Pulmonary immunization using antigen 85-B polymeric microparticles to boost tuberculosis immunity. *AAPS J.* **12**, 338–347 (2010).
229. Horwitz, M. A., Lee, B. W., Dillon, B. J. & Harth, G. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 1530–1534 (1995).
230. Vila, Y. *et al.* Role of TNF-Alpha , IFN-Gamma , and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. **2012**, (2015).
231. Mootoo, A., Stylianou, E., Arias, M. A. & Reljic, R. TNF- $\alpha$  in Tuberculosis : A Cytokine with a Split Personality. 53–62 (2009).
232. Olobo, J. O. *et al.* Circulating TNF-alpha, TGF-beta, and IL-10 in tuberculosis patients and healthy contacts. *Scand. J. Immunol.* **53**, 85–91 (2001).
233. Demissie, A. *et al.* The 6-kilodalton early secreted antigenic target-responsive, asymptomatic contacts of tuberculosis patients express elevated levels of interleukin-4 and reduced levels of gamma interferon. *Infect. Immun.* **74**, 2817–2822 (2006).
234. O'Garra, A., Barrat, F. J., Castro, A. G., Vicari, A. & Hawrylowicz, C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol. Rev.* **223**, 114–131 (2008).
235. Malumbres, M. Physiological Relevance of Cell Cycle Kinases. *Physiol. Rev.* **91**, 973–1007 (2011).
236. Mahmoudi, M., Azadmanesh, K., Shokrgozar, M. a, Journeay, W. S. & Laurent, S. Effect of

- nanoparticles on the cell life cycle. *Chem. Rev.* **111**, 3407–32 (2011).
237. Sible, J. C. & Tyson, J. J. Checkpoints in the Cell Cycle. (2002).
238. Nigg, E. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **17**, 471–480 (1995).
239. Malumbres, M. & Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 630–641 (2005).
240. Stewart, Z. A. & Pietenpol, J. A. p53 signaling and cell cycle checkpoints. **14**, (2001).
241. Besson, A., Dowdy, S. F. & Roberts, J. M. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Dev. Cell* **14**, 159–169 (2008).
242. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
243. Applied Biosystems. *Amplification Efficiency of TaqMan Gene Expression Assays*. (2006).
244. Jaeger, A., Weiss, D. G., Jonas, L. & Kriehuber, R. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology* **296**, 27–36 (2012).
245. Chan, J. *et al.* In vitro toxicity evaluation of 25-nm anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles in immortalized keratinocyte cells. *Biol. Trace Elem. Res.* **144**, 183–96 (2011).
246. Rauch, J., Kolch, W., Laurent, S. & Mahmoudi, M. Big Signals from Small Particles: Regulation of Cell Signaling Pathways by Nanoparticles. *Chem. Rev.* (2013).
247. Sahay, G., Alakhova, D. Y. & Kabanov, A. V. Endocytosis of nanomedicines. *J. Control. Release* **145**, 182–95 (2010).
248. Hagiwara, M. *et al.* Caveolin-1 activates Rab5 and enhances endocytosis through direct interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 73–8 (2009).
249. Bohmer, N. & Jordan, A. Caveolin-1 and CDC42 mediated endocytosis of silica-coated iron oxide nanoparticles in HeLa cells. *Beilstein J. Nanotechnol.* **6**, 167–176 (2015).
250. Sauvonnnet, N., Dujeancourt, A. & Dautry-Varsat, A. Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of  $\gamma$ c cytokine receptor. *J. Cell Biol.* **168**, 155–163 (2005).
251. Cao, H. *et al.* Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2162–70 (2003).
252. Samaj, J. *et al.* Endocytosis, Actin Cytoskeleton, and Signaling. *Plant Physiol.* **135**, 1150–1161 (2004).

253. Modregger, J., Ritter, B., Witter, B., Paulsson, M. & Plomann, M. All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. **4521**, 4511–4521 (2000).
254. Wu, J., Sun, J. & Xue, Y. Involvement of JNK and P53 activation in G2/M cell cycle arrest and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in neuron cells. *Toxicol. Lett.* **199**, 269–76 (2010).
255. Wang, Y. *et al.* Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 5519–5530 (2015).
256. Kansara, K. *et al.* TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Induce DNA Double Strand Breaks and Cell Cycle Arrest in Human Alveolar Cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **56**, 204–217 (2015).
257. Clarke, P. R. & Zhang, C. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 464–77 (2008).
258. Joseph, J., Tan, S.-H., Karpova, T. S., McNally, J. G. & Dasso, M. SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J. Cell Biol.* **156**, 595–602 (2002).
259. Vorpahl, M. *et al.* The Ran GTPase-activating protein (RanGAP1) is critically involved in smooth muscle cell differentiation, proliferation and migration following vascular injury: implications for neointima formation and restenosis. *PLoS One* **9**, e101519 (2014).
260. Chang, K.-C. *et al.* Ran GTPase-activating protein 1 is a therapeutic target in diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One* **8**, e79863 (2013).
261. Swaminathan, S. *et al.* RanGAP1\*SUMO1 is phosphorylated at the onset of mitosis and remains associated with RanBP2 upon NPC disassembly. *J. Cell Biol.* **164**, 965–971 (2004).
262. Kimura, K., Cuvier, O. & Hirano, T. Chromosome condensation by a human condensin complex in *Xenopus* egg extracts. *J. Biol. Chem.* **276**, 5417–20 (2001).
263. Liang, M.-L. *et al.* Downregulation of miR-137 and miR-6500-3p promotes cell proliferation in pediatric high-grade gliomas. *Oncotarget* **7**, 19723–19737 (2016).
264. Liberman, N., Marash, L. & Kimchi, A. The translation initiation factor DAP5 is a regulator of cell survival during mitosis. *Cell Cycle* **8**, 204–209 (2009).
265. Marash, L. *et al.* DAP5 Promotes Cap-Independent Translation of Bcl-2 and CDK1 to Facilitate Cell Survival during Mitosis. *Mol. Cell* **30**, 447–459 (2008).
266. Suh, E. J., Kim, T. Y. & Kim, S. H. PP2C-mediated S-phase accumulation induced by the

- proteasome-dependent degradation of p21WAF1/CIP1. *FEBS Lett.* **580**, 6100–6104 (2006).
267. Liu, S., Xu, L., Zhang, T., Ren, G. & Yang, Z. Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. *Toxicology* **267**, 172–7 (2010).
268. Knoops, B. *et al.* Cloning and Characterization of AOEB166, a Novel Mammalian Antioxidant Enzyme of the Peroxiredoxin Family. *October* **274**, 30451–30458 (1999).
269. Collard, C. D., Montalto, M. C., Reenstra, W. R., Buras, J. a & Stahl, G. L. Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: role of cytokeratin 1. *Am. J. Pathol.* **159**, 1045–54 (2001).
270. Alinovi, R. *et al.* Oxidative and pro-inflammatory effects of cobalt and titanium oxide nanoparticles on aortic and venous endothelial cells. *Toxicol. Vitro.* **29**, 426–437 (2015).
271. Roth, W. *et al.* Keratin 1 maintains skin integrity and participates in an inflammatory network in skin through interleukin-18. *J. Cell Sci.* **125**, 5269–79 (2012).
272. Szklarczyk, D. *et al.* The STRING database in 2011: Functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res.* **39**, 561–568 (2011).
273. Szklarczyk, D. *et al.* The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* **45**, D362–D368 (2017).
274. Mastroberardino, L. *et al.* Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* **395**, 288–291 (1998).
275. Milkereit, R. *et al.* LAPTM4b recruits the LAT1-4F2hc Leu transporter to lysosomes and promotes mTORC1 activation. *Nat. Commun.* **6**, 1–9 (2015).
276. Nyati, M. K., Morgan, M. A., Feng, F. Y. & Lawrence, T. S. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 876–885 (2006).
277. Choi, D.-S. *et al.* Quantitative proteomics of extracellular vesicles derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells. *J. Extracell. Vesicles* **1**, 18704 (2012).
278. Waisman, D. M. Annexin II tetramer: structure and function. *Mol. Cell. Biochem.* **149–150**, 301–322 (1995).
279. Gruenberg, J. & Emans, N. Annexins in membrane traffic. *Trends Cell Biol.* **3**, 224–227 (1993).
280. Giannini, A. L., Vivanco, M. D. M. & Kypta, R. M.  $\alpha$ -Catenin inhibits  $\beta$ -catenin signaling by preventing formation of a  $\beta$ -catenin·T-cell factor·DNA complex. *J. Biol. Chem.* **275**,

- 21883–21888 (2000).
281. Ji, H. *et al.* EGF-induced ERK activation promotes CK2-mediated disassociation of  $\alpha$ -catenin from  $\beta$ -catenin and transactivation of  $\beta$ -catenin. **36**, 547–559 (2009).
  282. Choi, S. H., Estarás, C., Moresco, J. J., Yates, J. R. & Jones, K. A.  $\alpha$ -Catenin interacts with APC to regulate  $\beta$ -catenin proteolysis and transcriptional repression of Wnt target genes. *Genes Dev.* **27**, 2473–2488 (2013).
  283. Daniels, T. R. *et al.* The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin. Immunol.* **121**, 144–158 (2006).
  284. Daniels, T. R. *et al.* Transferrin receptors and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 291–317 (2012).
  285. Calzolari, A. *et al.* Transferrin receptor 2 is frequently expressed in human cancer cell lines. *Blood Cells, Mol. Dis.* **39**, 82–91 (2007).
  286. Byrne, J. D., Betancourt, T. & Brannon-Peppas, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1615–1626 (2008).
  287. Kawabata, H. *et al.* Molecular cloning of transferrin receptor 2. *J. Biol. Chem.* **274**, 20826 (1999).
  288. Hwang, A. a. *et al.* Functional Nanovalves on Protein-Coated Nanoparticles for In vitro and In vivo Controlled Drug Delivery. *Small* **11**, 319–328 (2015).
  289. Yotsumoto, F. *et al.* Efficacy of ligand-based targeting for the EGF system in cancer. *Anticancer Res.* **29**, 4879–4885 (2009).
  290. Martens, T. F., Remaut, K., Demeester, J., De Smedt, S. C. & Braeckmans, K. Intracellular delivery of nanomaterials: How to catch endosomal escape in the act. *Nano Today* **9**, 344–364 (2014).
  291. Barua, S. & Mitragotri, S. Challenges associated with Penetration of Nanoparticles across Cell and Tissue Barriers: A Review of Current Status and Future Prospects. *Nano Today* **9**, 223–243 (2014).
  292. Setyawati, M. I., Yuan, X., Xie, J. & Leong, D. T. The influence of lysosomal stability of silver nanomaterials on their toxicity to human cells. *Biomaterials* **35**, 6707–6715 (2014).
  293. Paris, J. L., Colilla, M., Izquierdo-Barba, I., Manzano, M. & Vallet-Regí, M. Tuning mesoporous silica dissolution in physiological environments: a review. *J. Mater. Sci.* **52**, 8761–8771 (2017).

294. Sabella, S. *et al.* A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale* **6**, 7052 (2014).
295. Loza, K. *et al.* The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media. *J. Mater. Chem. B* **2**, 1634 (2014).
296. Kumar, C. S. S. R. *Nanomaterials - Toxicity, Health and Environmental Issues*. (Wiley, 2006).
297. AshaRani, P. V., Mun, G. L. K., Hande, M. P. & Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanomaterials. *ACS Nano* **3**, 279–290 (2009).
298. Miyayama, T. & Matsuoka, M. Involvement of lysosomal dysfunction in silver nanoparticle-induced cellular damage in A549 human lung alveolar epithelial cells. *J. Occup. Med. Toxicol.* **11**, 1–6 (2016).
299. Park, E. J., Yi, J., Kim, Y., Choi, K. & Park, K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol. Vitro.* **24**, 872–878 (2010).
300. Zhang, D. *et al.* Down-regulation of CHERP inhibits neuroblastoma cell proliferation and induces apoptosis through ER stress induction. *Oncotarget* **8**, 80956–80970 (2017).
301. O'Rourke, F. a, LaPlante, J. M. & Feinstein, M. B. Antisense-mediated loss of calcium homoeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP; ERPROT213-21) impairs Ca<sup>2+</sup> mobilization, nuclear factor of activated T-cells (NFAT) activation and cell proliferation in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem. J.* **373**, 133–143 (2003).
302. Bol, G. M., Xie, M. & Raman, V. DDX3, a potential target for cancer treatment. *Mol. Cancer* **14**, (2015).
303. Alshareeda, A. T. *et al.* KPNA2 is a nuclear export protein that contributes to aberrant localisation of key proteins and poor prognosis of breast cancer. *Br. J. Cancer* **112**, 1929–1937 (2015).
304. Takada, T. *et al.* KPNA2 over-expression is a potential marker of prognosis and therapeutic sensitivity in colorectal cancer patients. *J. Surg. Oncol.* **113**, 213–217 (2016).
305. Yoshitake K *et al.* Importin-alpha1 as a novel prognostic target for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* **18**, 2093–2103 (2011).
306. Huang, L. *et al.* KPNA2 promotes cell proliferation and tumorigenicity in epithelial ovarian carcinoma through upregulation of c-Myc and downregulation of FOXO3a. *Cell Death Dis.* **4**, (2013).
307. Liu, X. *et al.* Trip12 is an E3 ubiquitin ligase for USP7/HAUSP involved in the DNA



- damage response. *FEBS Lett.* **590**, 4213–4222 (2016).
308. Cui, D. *et al.* The ribosomal protein S26 regulates p53 activity in response to DNA damage. *Oncogene* **33**, 2225–2235 (2014).
309. Wang, Y., Huang, J. W., Castella, M., Huntsman, D. G. & Taniguchi, T. p53 is positively regulated by miR-542-3p. *Cancer Res.* **74**, 3218–3227 (2014).
310. Asadi, M. H., Derakhshani, A. & Mowla, S. J. Concomitant upregulation of nucleostemin and downregulation of Sox2 and Klf4 in gastric adenocarcinoma. *Tumor Biol.* **35**, 7177–7185 (2014).
311. Lo, D. *et al.* Nucleostemin stabilizes ARF by inhibiting the ubiquitin ligase ULF. *Oncogene* **34**, 1688–1697 (2015).
312. Jain, M. *et al.* Metabolite Profiling Identifies a Key Role for Glycine in Rapid Cancer Cell Proliferation. *Science (80-. ).* **336**, 1040–1044 (2012).
313. Woo, C. C., Chen, W. C., Teo, X. Q., Radda, G. K. & Hock Lee, P. T. Downregulating serine hydroxymethyltransferase 2 (SHMT2) suppresses tumorigenesis in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **7**, 53005–53017 (2016).
314. Yao, Z. *et al.* shRNA-mediated silencing of the RFC3 gene suppresses hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Int. J. Mol. Med.* **36**, 1393–1399 (2015).
315. Gutschner, T. *et al.* Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) is an important protumorigenic factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **59**, 1900–1911 (2014).
316. Fuller-Pace, F. V. DEAD box RNA helicase functions in cancer. *RNA Biol.* **10**, 121–132 (2013).
317. Rangel, R. *et al.* Identification of new tumor suppressor genes in triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* **77**, 4089–4101 (2017).
318. Pignatelli, J., Jones, M. C., LaLonde, D. P. & Turner, C. E. Beta2-Adaptin Binds Actopaxin and Regulates Cell Spreading, Migration and Matrix Degradation. *PLoS One* **7**, (2012).
319. Unfried, K. *et al.* Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology* **1**, 52–71 (2007).
320. Basu, A. *et al.* Expression of the stress response oncoprotein LEDGF/p75 in human cancer: A study of 21 tumor types. *PLoS One* **7**, 26–29 (2012).
321. Polo, S. E. *et al.* Regulation of DNA-End Resection by hnRNPU-like Proteins Promotes DNA Double-Strand Break Signaling and Repair. *Mol. Cell* **45**, 505–516 (2012).



322. Bauerschmidt, C. *et al.* Cohesin promotes the repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in replicated chromatin. *Nucleic Acids Res.* **38**, 477–487 (2009).
323. Coker, H. & Brockdorff, N. SMCHD1 accumulates at DNA damage sites and facilitates the repair of DNA double-strand breaks. *J. Cell Sci.* **127**, 1869–1874 (2014).
324. Daniels, T. *et al.* Antinuclear autoantibodies in prostate cancer: Immunity to LEDGF/p75, a survival protein highly expressed in prostate tumors and cleaved during apoptosis. *Prostate* **62**, 14–26 (2005).
325. Smoluchowski, M. V. *Handbuch der Electricitat und des Magnetismus.* Barth (1921).
326. Lowell, S., Shields, J. E., Thomas, M. A. & Thommes, M. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure Appl. Chem.* **54**, (1982).
327. Lowell, S., Shields, J. E., Thomas, M. A. & Thommes, M. *Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density.* (Springer, 2004).
328. Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibnsouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. *J. Pharm. Anal.* **6**, 71–79 (2016).
329. Heatley, B. Y. N. G. & Wiuiam, S. A Method for the Assay of Penicillin. *Biochem. J* **38**, (1943).
330. Hasdorfer, J., Sompek, E., Allerberger, F., Dierich, M. P. & Rüscher-Gerdesm, S. E-test for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2**, 751–755 (1998).
331. Magaldi, S. *et al.* Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *Int. J. Infect.Dis.* **8**, 39–45 (2004).
332. Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibnsouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. *J. Pharm. Anal.* **6**, 71–79 (2016).
333. Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D. and & Schnekenburger, J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **72**, 370–7 (2009).
334. Guadagnini, R. *et al.* Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology* **9**, 13–24 (2013).
335. Holder, A. L., Goth-Goldstein, R., Lucas, D. & Koshland, C. P. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 1885–92 (2012).

336. Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D. & Schnekenburger, J. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Arch. Toxicol.* **86**, 1123–36 (2012).
337. Gault, Victor A. and McClenaghan, N. H. *Understanding Bioanalytical Chemistry: Principles and applications*. (2009).
338. Ibrahim, S. F. & Van Den Engh, G. *Flow cytometry and cell sorting. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **106**, (2007).
339. Pozarowski, P. & Darzynkiewicz, Z. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. *Methods Mol. Biol.* **281**, 301–312 (2004).
340. Nunez, R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr. Issues Mol. Biol.* **3**, 67–70 (2001).
341. Darzynkiewicz, Z., Halicka, H. D. & Zhao, H. Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. *Adv. Exp. Med. Biol.* **675**, 137–147 (2010).
342. Jayat, C. & Ratinaud, M.-H. Cell cycle analysis by flow cytometry: Principles and applications. *Biol. Cell* **78**, 15–25 (1993).
343. Kang, S. J., Lee, Y. J., Lee, E.-K. & Kwak, M.-K. Silver nanoparticles-mediated G2/M cycle arrest of renal epithelial cells is associated with NRF2-GSH signaling. *Toxicol. Lett.* **211**, 334–41 (2012).
344. Huang, S., Chueh, P. J., Lin, Y. W., Shih, T. S. & Chuang, S. M. Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO<sub>2</sub> long-term exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **241**, 182–194 (2009).
345. Behzadi, S. *et al.* Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4218–4244 (2017).
346. Patiño, T., Soriano, J., Barrios, L., Ibáñez, E. & Nogués, C. Surface modification of microparticles causes differential uptake responses in normal and tumoral human breast epithelial cells. *Sci. Rep.* **5**, 1–12 (2015).
347. Van Amersfoort, E. S. & Van Strijp, J. A. G. Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes. *Cytometry* **17**, 294–301 (1994).
348. Luque-Garcia, J. L., Sanchez-Díaz, R., Lopez-Heras, I., Camara, C. & Martin, P. Bioanalytical strategies for in-vitro and in-vivo evaluation of the toxicity induced by metallic nanoparticles. *TrAC Trends Anal. Chem.* **43**, 254–268 (2013).
349. Pilhofer, M., Ladinsky, M. S., McDowall, A. W. & Jensen, G. J. in *Methods in Cell Biology* **96**,

- 21–45 (Elsevier Inc., 2010).
350. Callaway, E. The Revolution Will Not Be Crystallized. *Nature* **525**, 172–174 (2015).
351. Krumlauf, R. Analysis of Gene Expression by Northern Blot. *Mol. Biotechnol.* **2**, 227 (1994).
352. Sabelli, P. & Shewry, P. Northern analysis and nucleic acid probes. *Methods Mol Biol* **49**, 213–228 (1995).
353. Southern, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503–517 (1975).
354. Zimmers, T. Northern Blotting and RNA Detection. *Encycl. Life Sci.* 1–7 (2001). doi:10.1038/npg.els.0000997
355. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science (80-. )*. **270**, 467–470 (1995).
356. Schena, M. Genome analysis with gene expression microarrays. *BioEssays* **18**, 427–431 (1996).
357. Gall, J. G. & Pardue, M. Lou. Formation and Detection of Rna-Dna Hybrid Molecules in Cytological Preparations\*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **63**, 378–383 (1969).
358. Jensen, E. Technical Review: in situ hybridization. *Anat. Rec. (Hoboken)*. **0**, 1349–1353 (2014).
359. Manz, A., Pamme, N. & Lossifidis, D. *Bionalytical chemistry*. (2004).
360. Joshi, M. & Deshpande, J. D. Polymerase Chain Reaction : Methods , Principles and application. *Int. J. Biomed. Res.* **1**, 81–97 (2010).
361. Ma, H., Shieh, K., Chen, G., Qiao, X. T. & Chuang, M. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction ( RT-PCR ). **2**, 1–15 (2006).
362. Manz, A., Pamme, N. & Lossifidis, D. *bionalytical chemistry*. (2004).
363. Pfaffl, M. Quantification strategies in real-time PCR Michael W . Pfaffl. *A-Z Quant. PCR* 87–112 (2004). doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10551-011-0963-1
364. Burnette, W. N. ‘Western Blotting’: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195–203 (1981).
365. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from

- polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350–4354 (1979).
366. Mahmood, T. & Yang, P. C. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* **4**, 429–434 (2012).
  367. Kurien, B. T. & Scofield, R. H. *Western blotting. Methods in Molecular Biology* **1312**, (2015).
  368. Fowler, S. J. Use of monoclonal antibodies for western blotting with enhanced chemiluminescent detection. *Methods Mol. Biol.* **45**, 115–27 (1995).
  369. Alegria-Schaffer, A., Lodge, A. & Vattem, K. *Performing and Optimizing Western Blots with an Emphasis on Chemiluminescent Detection. Methods in Enzymology* **463**, (Elsevier Inc., 2009).
  370. Western Blotting Technical Manual: Amersham International plc. (1991).
  371. Sanchez, F. G., Díaz, A. N. & García, J. A. G. P-phenol derivatives as enhancers of the chemiluminescent luminol-horseradish peroxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaction: substituent effects. *J. Lumin.* **65**, 33–39 (1995).
  372. Yang, L. *et al.* Study on enhancement principle and stabilization for the luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HRP chemiluminescence system. *PLoS One* **10**, 1–14 (2015).
  373. Aydin, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* **72**, 4–15 (2015).
  374. Hnasko, R. M. *Elisa. Methods in Molecular Biology* **1318**, (2015).
  375. Khatkhatay, M. I. & Desai, M. A comparison of performances of four enzymes used in ELISA with special reference to  $\beta$ -lactamase. *J. Immunoassay* **20**, 151–183 (1999).
  376. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871–874 (1971).
  377. Van Weemen, B. K. & Schuurs, A. H. W. M. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* **15**, 232–236 (1971).
  378. Lindström, P. & Wager, O. IgG Autoantibody to Human Serum Albumin Studied by the ELISA-Technique. *Scand. J. Immunol.* **7**, 419–425 (1978).
  379. Kato, K. *et al.* Use of rabbit antibody IgG bound onto plain and aminoalkylsilyl glass surface for the enzyme-linked sandwich immunoassay. *J. Biochem.* **82**, 261–266 (1977).
  380. Yorde, D. E., Sasse, E. A. & Wang, T. Y. Competitive enzyme linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human

- choriogonadotropin. *Clin. Chem.* **22**, 1372–1377 (1976).
381. Pandey, a & Mann, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**, 837–846 (2000).
382. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (80-. ).* **246**, 64–71 (1989).
383. Karas, M. & Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299–2301 (1988).
384. Banerjee, S. & Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, 1–40 (2012).
385. Aebersold, R. & Goodlett, D. R. Mass spectrometry in proteomics. *Chem. Rev.* **101**, 269–295 (2001).
386. Mann, M., Hendrickson, R. C. & Pandey, A. Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 437–473 (2001).
387. Mirzaei, H. *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications.* **919**, (Springer, 2016).
388. *Comprehensive Analytical Chemistry.* (Elsevier, 2009).
389. Eliuk, S. & Makarov, A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **8**, 61–80 (2015).
390. Palzs, B. & Suhal, S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 508–548 (2005).
391. Paša-Tolic, L. & Jensen, P. High throughput proteome-wide precision measurements of protein expression using mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7949–7950 (1999).
392. Oda, Y., Huang, K., Cross, F. R., Cowburn, D. & Chait, B. T. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 6591–6596 (1999).
393. Gygi, S. P. *et al.* Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* **17**, 994–9 (1999).
394. de Leenheer, A. P. & Thienpont, L. M. Applications of isotope dilution-mass spectrometry in clinical chemistry, pharmacokinetics, and toxicology. *Mass Spectrom. Rev.* **11**, 249–307 (1992).
395. Lindemann, C. *et al.* Strategies in relative and absolute quantitative mass spectrometry

- based proteomics. *Biol. Chem.* **398**, 687–699 (2017).
396. Marcus, K. *Quantitative Methods in Proteomics. Methods in Molecular Biology* **893**, (2012).
397. Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M. M. & Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: Critical review update from 2007 to the present. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 939–965 (2012).
398. Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W. & Gygi, S. P. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 6940–6945 (2003).
399. Kuster, B., Schirle, M., Mallick, P. & Aebersold, R. Scoring proteomes with proteotypic peptide probes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 577–583 (2005).
400. Kirkpatrick, D. S., Gerber, S. A. & Gygi, S. P. The absolute quantification strategy: A general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods* **35**, 265–273 (2005).
401. Schmidt, C., Lenz, C., Grote, M., Luhrmann, R. & Urlaub, H. Determination of Protein Stoichiometry within Protein Complexes Using Absolute Quantification and Multiple Reaction Monitoring. *Anal. Chem.* **82**, 2784–2796 (2010).
402. Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. & Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: A critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1017–1031 (2007).
403. Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A. I. & Mann, M. Large-Scale Proteomic Analysis of the Human Spliceosome Large-Scale Proteomic Analysis of the Human Spliceosome. *Genome Res.* 1231–1245 (2002).
404. Ishihama, Y. *et al.* Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1265–1272 (2005).
405. Lu, P., Vogel, C., Wang, R., Yao, X. & Marcotte, E. M. Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nat. Biotechnol.* **25**, 117–124 (2007).
406. Ong, S.-E. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 376–386 (2002).
407. Van Hoof, D. *et al.* An experimental correction for arginine-to-proline conversion artifacts in SILAC-based quantitative proteomics. *Nat. Methods* **4**, 677–678 (2007).

- 408. Ong, S.-E., Kratchmarova, I. & Mann, M. Properties of 13 C-Substituted Arginine in Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC). *J. Proteome Res.* **2**, 173–181 (2003).
- 409. Ross, P. L. *et al.* Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 1154–1169 (2004).
- 410. Wiese, S., Reidegeld, K. A., Meyer, H. E. & Warscheid, B. Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* **7**, 340–350 (2007).
- 411. Megger, D. A. *et al.* Proteomic Differences Between Hepatocellular Carcinoma and Nontumorous Liver Tissue Investigated by a Combined Gel-based and Label-free Quantitative Proteomics Study. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 2006–2020 (2013).
- 412. Megger, D. A., Bracht, T., Meyer, H. E. & Sitek, B. Label-free quantification in clinical proteomics. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1834**, 1581–1590 (2013).
- 413. Wiener, M. C., Sachs, J. R., Deyanova, E. G. & Yates, N. A. Differential mass spectrometry: A label-free LC-MS method for finding significant differences in complex peptide and protein mixtures. *Anal. Chem.* **76**, 6085–6096 (2004).
- 414. Maerkens, A., Kley, R. A., Olivé, M. & Theis, V. Differential proteomic analysis of abnormal intramyoplasmic aggregates in desminopathy. *J. Proteomics* **2**, 14–27 (2013).
- 415. Washburn, M. P., Wolters, D. & Yates, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**, 242–247 (2001).
- 416. Liu, H., Sadygov, R. G. & Yates, J. R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal. Chem.* **76**, 4193–4201 (2004).

**ANEXO A. TÉCNICAS DE  
CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA Y  
BIOANALÍTICA**

---





## A.1. Técnicas de caracterización analítica

### A.1.1. Análisis termogravimétrico y térmico diferencial y microanálisis elemental de C, H, N y S

Los análisis termogravimétrico y térmico diferencial se realizaron en un analizador Perkin Elmer Pyris Diamond TG/DTA (Perkin Elmer, California, EE. UU.). Las medidas se llevaron a cabo con aproximadamente 5 mg de muestra, los cuales se introducen en un crisol de aluminio y se les aplican rampas de calentamiento de 5 °C/min, desde la temperatura ambiente hasta los 600 °C, bajo una velocidad de flujo de 100 mL/min de aire.

Los microanálisis químicos fueron realizados con un Perkin Elmer 2400 CHN y un termoanalizador LECO CHNS-932.

Estos análisis dan idea del contenido de materia orgánica que presentan los materiales a lo largo de las modificaciones y funcionalizaciones que se realizan, así como las variaciones de los contenidos de diferentes elementos clave en las reacciones de funcionalización.

### A.1.2. Difracción de rayos X

Las medidas de difracción de rayos X en polvo (DRX) se realizaron en un difractómetro Philips X' Pert con geometría Bragg-Brentano que funciona con radiación Cu K $\alpha$ , con 1.5406 Å de longitud de onda, a 40 kV y 20 mA (Philips Electronics NV, Eindhoven, Países Bajos).

En el caso de las MSNs esta técnica se emplea a bajos ángulos (0.2° a 10° 2 $\theta$ ), ya que, las paredes de la sílice no presentan estructura cristalina y por lo tanto no muestran reflexiones a altos ángulos (5.0° a 80.0° 2 $\theta$ ). Los perfiles de DRX a bajos ángulos, sin embargo, permiten caracterizar la estructura mesoporosa ordenada de las MSNs, dando idea de la topología de los poros y la distancia poro-poro promedio, así como del tipo de estructura mesoporosa que presentan, ya que los perfiles son diferentes para los distintos ordenamientos porosos. Por ello los patrones de DRX, de bajo ángulo, se llevan a cabo en un rango de 2 $\theta$  entre 0.6 y 8° con un tamaño de paso de 0.02° y un tiempo de contacto en cada paso de 5s.

Pero, en el caso de MSNs que presentan nanopartículas inorgánicas, como las AgNPs presentes en esta Tesis, está técnica puede a su vez identificar la fase cristalina de las nanopartículas nucleadas sobre las MSNs. Para ello, las medidas se llevan a cabo a altos ángulos, en concreto las medidas de la presente Tesis se han llevado a cabo en un rango de 2 $\theta$  entre 15 y 100° con un tamaño de paso de 0.04° y un tiempo de contacto por paso de 1s.

### A.1.3. Resonancia magnética nuclear de $^{29}\text{Si}$ y $^{13}\text{C}$ en estado sólido

La resonancia magnética nuclear de sólidos fue realizada con la técnica de rotación en el ángulo mágico (MAS-NMR) y con la combinación de ésta con la polarización cruzada. Esta

técnica de resonancia magnética nuclear (MAS-NMR) para sólidos permite mejorar la resolución de espectros eliminando la anisotropía del desplazamiento químico y disminuir los efectos del acoplamiento dipolar homonuclear así como las interacciones dipolares heteronucleares. La polarización cruzada acoplada a esta técnica (CP-MAS-NMR) permite el aumento de la intensidad de la señal de los núcleos escasos mediante la transferencia de polarización de núcleos abundantes, como el  $^1\text{H}$ .

Las medidas se han llevado a cabo en un espectrómetro Bruker Avance AV-400WB, equipado con una sonda de estado sólido utilizando un rotor de 4 mm de circonio. En primer lugar, se realizaron experimentos de NMR de  $^{13}\text{C}$  con desacoplamiento de protones, la frecuencia del espectrómetro se fijó en 100.62 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) y 400.13 MHz ( $^1\text{H}$ ) y la velocidad de rotación del MAS se mantuvo en 6 kHz. El espectro de NMR consistió en 15000 a 17500 adquisiciones con tiempos de contacto de polarización cruzada de 2 ms, con pulsos de 2.5  $\mu\text{s}$  de ancho y un periodo de 5 s entre pulsos. Los valores de desplazamientos químicos se referenciaron en 176.1 ppm al carbono del carbonilo de la glicina. Por otro lado, se obtuvieron espectros cuantitativos NMR de  $^{29}\text{Si}$  a 79.49 MHz con una velocidad de rotación MAS de 12 kHz, los pulsos empleados presentaban un ancho de 4.5  $\mu\text{s}$  y un periodo de 5 s entre ellos con un número de escaneos finales de 17000 a 20000. A su vez, se ha empleado la técnica de polarización cruzada para el  $^{29}\text{Si}$  ajustando la frecuencia del transmisor a 79.49 MHz ( $^{29}\text{Si}$ ) y 400.13 MHz ( $^1\text{H}$ ) y con una velocidad de giro de 12 KHz. El tiempo de contacto de polarización cruzada se fijó en 3.5 ms, con pulsos de 4.5  $\mu\text{s}$  y un periodo de tiempo entre las sucesivas acumulaciones de 5s. Todos los valores de desplazamiento químico se referenciaron externamente a 0 ppm a la sal sódica del ácido 3- (trimetilsilil)-1-propanosulfónico (sal sódica DSS).

Esta técnica proporciona información relevante sobre el anclaje de moléculas en la red de sílice, así como sobre el grado de condensación del material. Las medidas de  $^{13}\text{C}$  permiten obtener información sobre el tipo de anclaje de las moléculas en la superficie de las MSNs. Por otro lado, las medidas de NMR de  $^{29}\text{Si}$  permiten conocer los entornos de la red de sílice dando idea de la relación sílice/organosílice de los materiales híbridos. En las MSNs sin funcionalizar, se observan principalmente las señales de tipo  $\text{Q}^n$ , donde Q se refiere a las especies siloxano  $[\text{Si}(\text{OSi})_n(\text{OX})_{4-n}]$ , siendo  $n = 2-4$  el número de átomos de oxígeno puente que rodean al átomo de silicio central y X grupos alquilo o H. Las unidades estructurales  $\text{Q}^4$  representan tetraedros  $\text{SiO}_4$  interconectados,  $[\text{Si}(\text{OSi})_4]$ , que forman parte de las paredes de sílice. Las unidades  $\text{Q}^3$  representan las especies  $[\text{Si}(\text{OSi})_3(\text{OX})]$  y las unidades  $\text{Q}^2$  corresponden a  $[\text{Si}(\text{OSi})_2(\text{OX})_2]$ , generalmente grupos Si-OH germinales. La aparición de las señales de tipo  $\text{T}^m$  ( $m = 1-3$ ) en materiales mixtos confirma la existencia de enlaces covalentes entre la superficie de sílice y los grupos orgánicos. Estas señales se corresponderían con:  $\text{T}^1$  con la especie  $[\text{R-Si}(\text{OSi})(\text{OX})_2]$ ,  $\text{T}^2$

con  $[\text{R-Si}(\text{OSi})_2(\text{OX})]$  y  $\text{T}^3$  con  $[\text{R-Si}(\text{OSi})_3]$ . A modo general, la aparición de estas señales viene acompañada de la reducción de las señales  $\text{Q}^2$  y  $\text{Q}^3$  y el aumento de las señales  $\text{Q}^4$ .

#### A.1.4. Potencial Zeta ( $\zeta$ ) y Dispersión de luz dinámica (DLS)

Los valores del potencial zeta ( $\zeta$ ) de las nanopartículas se obtuvieron mediante medidas de movilidad electroforética de los materiales suspendidos en el agua. Las medidas se realizaron en un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) equipado con un láser de 633 nm. Para ello, se añadió 1 mg de nanopartículas a 10 ml de agua, y se dispersaron con ayuda de ultrasonidos y agitación asistida con vórtice para obtener una suspensión homogénea. Las mediciones se registraron colocando aproximadamente 1 mL de dicha suspensión en cubetas DTS1070 (Malvern Instruments). El potencial  $\zeta$ , que corresponde con el límite de la doble capa eléctrica que se forma en torno a una partícula en suspensión, da una idea de la potencial estabilidad del sistema. Se puede describir por la ecuación de Smoluchowski  $\zeta = 4\pi\eta U/\epsilon$  donde  $U$  es la movilidad electroforética,  $\eta$  es la viscosidad del agua, y  $\epsilon$  es la constante dieléctrica del agua.<sup>325</sup>

Por otro lado, el tamaño hidrodinámico de las partículas se relaciona con el correspondiente movimiento browniano de las mismas que hace que el haz de luz del láser se disperse con diferentes intensidades y da idea del tamaño de las partículas en la suspensión. El tamaño hidrodinámico de las nanopartículas fue medido por dispersión dinámica de luz (DLS) con el mismo instrumento Malvern.

#### A.1.5. Porosimetría de adsorción de gases

Las propiedades texturales de los materiales se han determinado empleando la porosimetría de adsorción de  $\text{N}_2$  mediante la utilización de un microporosímetro ASAP 2020 (Micromeritics Co., Norcross, EE. UU.). Para realizar las mediciones de  $\text{N}_2$ , aproximadamente 30 mg de cada muestra fueron previamente sometidos a vacío durante 24 h a 40 °C para eliminar moléculas fisisorbidas de la superficie de los materiales como por ejemplo moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Esta técnica permite obtener información sobre la superficie externa e interna de los materiales porosos. En función del tipo de isoterma de adsorción y desorción se pueden clasificar los materiales en diferentes tipos y conocer distintos parámetros texturales (Figura A.1).<sup>326</sup>

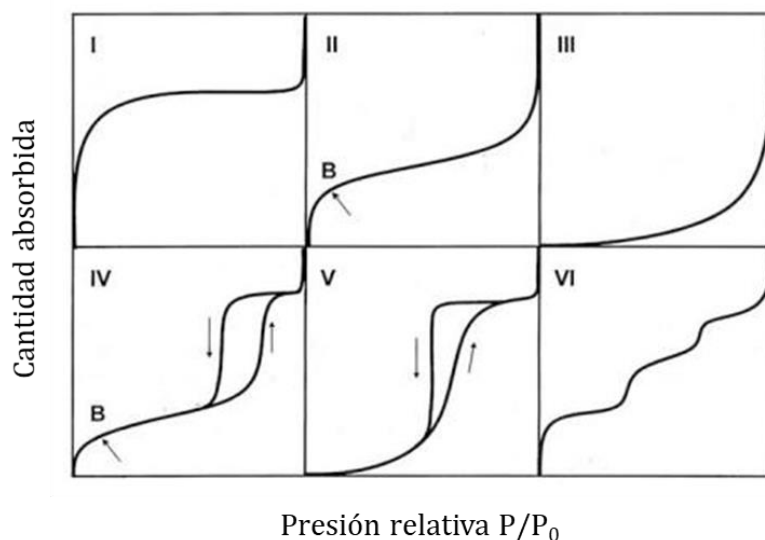


Figura A.1. Clasificación de isotermas según la IUPAC.

La superficie específica ( $S_{\text{BET}}$ ), que corresponde con la extensión geométrica de la superficie de las paredes de los poros por gramo de sólido adsorbente, se determina mediante el método Brunauer-Emmett-Teller (BET). El volumen de poro ( $V_p$ ), volumen total de poros por gramo de adsorbente, se calcula a partir de la cantidad de  $N_2$  adsorbida a una presión relativa de 0.98. La distribución del tamaño de los poros entre 0.5 y 40 nm se calcula a partir de la isoterma de desorción mediante el método Barrett-Joyner-Halenda (BJH) y el tamaño medio del mesoporo ( $D_p$ ) se determina a partir del máximo de la curva de distribución del tamaño de los poros.<sup>327</sup>

Toda la información que se puede obtener de una isoterma de adsorción se basa en las diferentes regiones que se pueden encontrar en base a los valores de presiones relativas:

- $P/P_0$  entre 0 y 0.5: en esta región se produce la condensación capilar en los microporos y la formación de la monocapa en la superficie de los materiales.
- $P/P_0$  entre 0.15 y 0.95: en esta región los poros se llenan del gas y por ello es donde se observa el incremento brusco en la curva. De esta región se obtiene información sobre el tamaño de poro y el volumen del mismo.
- $P/P_0$  entre 0.95 y 1: a estos valores elevados de presiones relativas se rellenan los huecos entre partículas y por ello puede dar idea del tamaño de éstas.

#### A.1.6. Microscopía electrónica de barrido

La morfología superficial se analiza mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio JEOL JSM 6335F. Para este propósito, las muestras se depositaron en un

portamuestras de cobre mediante una cinta de grafito y se secaron a 70 °C durante 48 h bajo vacío. Previamente a la observación de las muestras se realiza una etapa de metalizado con una capa fina de oro puesto que se trata de materiales no conductores de la electricidad.

Esta técnica de microscopia permite obtener información sobre la topología y morfología de las partículas gracias a la interacción de los electrones de una sonda con la superficie del material de tal forma que los electrones secundarios que parten del material se detectan y conforman una imagen.

#### A.1.7. Microscopía electrónica de transmisión

Esta caracterización se ha llevado a cabo con un microscopio JEOL JEM 1400 o 2100 que operan a 120 y 200 kV, respectivamente (JEOL Ltd., Tokio, Japón). La preparación de la muestra se lleva a cabo dispersando aproximadamente 1 mg de muestra en 1 mL de 1-butanol, seguido de sonicación en baño de ultrasonidos de baja potencia (Selecta, España) durante 5 minutos, para conseguir una suspensión homogénea. Finalmente, se deposita una gota de la suspensión en una rejilla de cobre recubierta de carbono y se procede a su observación. En el caso de las nanopartículas de dióxido de titanio comerciales, en ambas fases, anatasa y rutilo, la caracterización se lleva a cabo a partir de una concentración de 200 mg/L preparadas en agua.

En un microscopio electrónico de transmisión la imagen obtenida se forma por los electrones que transmite la muestra cuando índice un haz de electrones sobre ella. Gracias a la resolución que presenta esta técnica permite visualizar la orientación y el tamaño de los poros, así como estudiar la homogeneidad y el grosor de los recubrimientos de las partículas. Además, combinando esta técnica con la espectroscopia de energía dispersiva de rayos, podemos identificar y cuantificar la composición elemental de áreas de muestra de un tamaño tan pequeño como de algunos micrómetros cúbicos.

#### A.1.8. Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X

Esta técnica puede acoplarse tanto a SEM como TEM y permite identificar y cuantificar la composición elemental de áreas de muestra de un tamaño tan pequeño como de algunos micrómetros cúbicos. El material de muestra es bombardeado con electrones y los rayos X producidos son medidos con un espectroscopio de rayos X. La radiación producida por este salto de electrones entre orbitales tiene una propiedad fundamental, y es que la energía de los fotones emitidos está directamente relacionada con el peso atómico del elemento emisor. Esto se debe a que la diferencia de energía entre orbitales aumenta según lo hace el peso atómico, como consecuencia principalmente del aumento del nº de protones en el núcleo. De este modo

es posible asociar cada valor de energía emitida con un elemento de la tabla periódica y el número de fotones producidos con la cantidad relativa de cada elemento.

### A.2. Técnicas bioanalíticas para la evaluación de los nanomateriales

El uso creciente de nanomateriales en diversas aplicaciones hace necesario el empleo de numerosas técnicas bioanalíticas para evaluar el potencial citotóxico de los mismos, así como su aplicabilidad en los diferentes ámbitos de estudio. A continuación, se muestran algunas de las técnicas más comunes en este tipo de estudios y que se han utilizado a lo largo de la presente Tesis.

#### A.2.1. *Métodos de evaluación de la capacidad o actividad antimicrobiana*

Los ensayos para determinar la susceptibilidad a especies antimicrobianas se pueden emplear para el descubrimiento de fármacos, la epidemiología y la predicción de resultados terapéuticos. Los métodos existentes pueden clasificarse en diferentes grupos destacando los métodos de difusión y los de dilución.<sup>328</sup> Generalmente los métodos de difusión se emplean para estudiar compuestos polares y los de dilución para sustancias polares y no polares.

Los **métodos de difusión**, desarrollados en 1940,<sup>329</sup> se basan en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento de la misma. Para ello se inoculan placas de agar con la bacteria a ensayar y posteriormente se deposita sobre ella un disco de papel de filtro impregnado con una cantidad conocida de la sustancia a estudiar. Tras la incubación de dichas placas durante un periodo de tiempo se puede medir el diámetro del halo de inhibición de crecimiento producido por el agente antimicrobiano. Por lo general las distintas concentraciones que se evalúan son ensayadas individualmente, pero existe también la opción de emplear un gradiente de concentración del agente a estudiar en el medio agar, lo cual permite la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).<sup>330</sup> En este caso, el agente de estudio se impregna en una tira en concentraciones crecientes de tal forma que para la determinación de MIC se considera la intersección de la tira con el halo de inhibición del crecimiento.

Una de las desventajas que presenta este método es la composición del papel de filtro, ya que los agentes de estudio pueden interaccionar con la celulosa y producirse así alteraciones en la difusión de los mismos. Por ello existe un método alternativo al descrito anteriormente, que se basa en la generación estéril de un orificio sobre el agar inoculado con el microorganismo a estudiar. En el interior del mismo se deposita un volumen del agente de estudio y se incuba durante un periodo, tras el cual se puede evaluar el halo de inhibición debido a la difusión del agente antimicrobiano por el agar.<sup>331</sup>

Es importante señalar que en los diferentes métodos basados en difusión el tamaño del halo de inhibición está influenciado por varios factores como el medio de cultivo, la capacidad de difusión, cantidad del inóculo, tiempo de generación del microorganismo, sensibilidad al agente de estudio y periodo de incubación. Por ello es importante una buena estandarización de dichos parámetros para una buena reproducibilidad.

Los **métodos de dilución**<sup>332</sup> son los más idóneos para la determinación de la MIC ya que ofrecen la posibilidad de estimar la concentración en agar (dilución en agar) o en medio de cultivo líquido (macrodilución o microdilución). La dilución en agar consiste en la incorporación de diversas concentraciones del agente microbiano en un medio agar fundido seguido de la inoculación de la especie microbiana de estudio en la parte superior de la placa. En el caso de la macrodilución o microdilución se emplean diluciones seriadas del agente de estudio preparadas en medio de cultivo líquido que se dispensan en tubos o placas multipocillos según si es macrodilución o microdilución, respectivamente. Posteriormente se inocula el microorganismo deseado preparado en el mismo medio de cultivo y tras un periodo de incubación se puede determinar la concentración mínima que inhibe el crecimiento del mismo. La determinación de MIC puede llevarse a cabo a nivel visual y puede ser determinada mediante la medida de la densidad óptica (OD), la cual es una medida basada en la turbidez de los cultivos lo que se traduce en diferencias en la cantidad de luz dispersada o transmitida a través de los cultivos.

#### A.2.2. Medida de la viabilidad celular

La viabilidad celular es uno de los parámetros más estudiados en la evaluación de citotoxicidad de partículas, ya sea en estudios toxicológicos o para la evaluación de las aplicaciones finales de dichos materiales, en las cuales se debe asegurar la biocompatibilidad de los mismos. Al hablar de citotoxicidad nos centramos en los cambios que se producen en las funciones básicas de las células debido al efecto de los agentes de estudio. Estos efectos van a depender del tiempo de incubación y de la concentración de los materiales usados. Por ello, existen diversos ensayos para la evaluación de la viabilidad celular que se basan en la integridad de la membrana celular o la actividad metabólica.

La membrana celular es una membrana delgada semi-permeable que rodea al citoplasma de la célula constituyendo una barrera funcional. Su función es proteger la integridad celular mediante el control del transporte de entrada y salida de la célula, el cual es regulado por receptores, transportadores y rutas de secreción. En ocasiones los materiales afectan a las funciones de dicha membrana y por ello, uno de los medios de evaluación de la viabilidad de las células es el uso de ensayos basados en **la integridad de la membrana celular**. Estos estudios se centran en el empleo de tintes o colorantes, como el azul de tripano o el yoduro de



propidio, que son compuestos que pueden atravesar la barrera funcional de la membrana de las células, únicamente en el caso de que ésta se encuentre dañada, y por ello son excluidos de las células sanas. Alternativamente, el daño en la membrana celular puede analizarse por la liberación de sustancias que normalmente se encuentran en el interior de las células sanas. Este es el caso de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), una proteína citoplasmática que se manifiesta cuando la membrana celular está dañada de tal manera que, la medida de dicha enzima en el medio de cultivo proporciona una idea de las células comprometidas no viables.

Otro de los aspectos importantes que es un indicativo temprano de daño celular es **la reducción de la actividad metabólica**. Por ello hay numerosos estudios que se centran en las medidas de niveles de ATP o actividad mitocondrial para evaluar el efecto de los diversos materiales. Uno de los métodos más empleado es el ensayo con sales de tetrazolio, como el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), que mide el potencial de reducción de la célula. Se basa en la capacidad de las células sanas para reducir el MTT a formazán por las reductasas mitocondriales. El formazán es un compuesto coloreado violeta cuya absorbancia se puede medir espectrofotométricamente a una longitud de onda entre 500-600 nm.

Sin embargo, dentro de todos los posibles ensayos para evaluar la viabilidad celular, se debe tener en cuenta que, si los agentes de estudios son nanomateriales, pueden aparecer distintas interferencias debido a las propiedades de los mismos. Esto implica que, en muchas ocasiones, la evaluación de los daños producidos tenga que ser realizada mediante modificaciones de los métodos convencionales que eviten las interferencias. Algunas de estas propiedades que pueden dar lugar a dichas interferencias son (Figura A.2):<sup>333</sup>

- Alta capacidad de adsorción, lo que permite que los nanomateriales puedan adsorber nutrientes y factores de crecimiento del medio de cultivo. Esto podría provocar una disminución de la viabilidad ocasionando resultados erróneos.
- Propiedades ópticas que pueden interferir en ensayos basados en medidas de absorbancia o fluorescencia.
- Actividad catalítica debida a su alta relación superficie/masa, que favorece la catálisis de reacciones que participan en el ensayo; alterando, por ejemplo, los datos reales en los métodos de medida de actividad enzimática.
- Propiedades magnéticas que pueden dar lugar a la generación de radicales libres y que afecten a aquellos ensayos basados en reacciones redox.
- La disolución de las NPs en medios biológicos puede originar su oxidación y, por tanto, la liberación de iones o trazas metálicas que interfieran en ensayos sensibles a metales.

- La acidez y alcalinidad, es decir el pH de las suspensiones o disoluciones de los nanomateriales, también puede afectar sobre los sustratos de los ensayos.

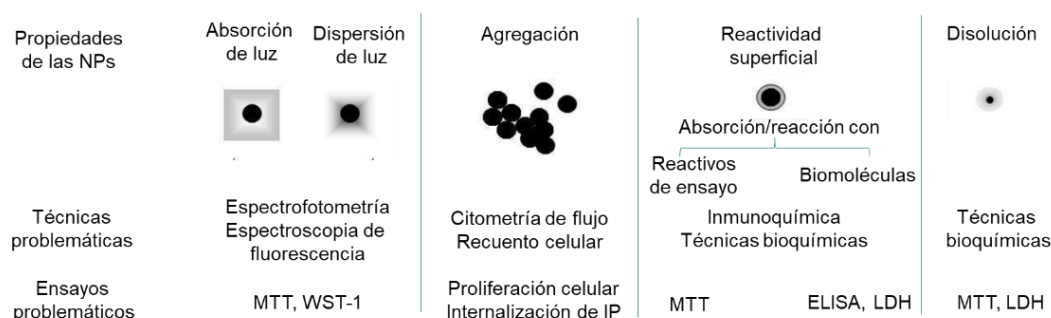


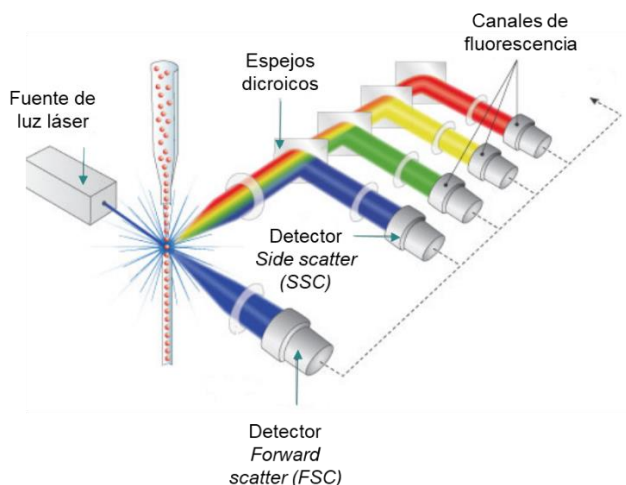
Figura A.2. Propiedades de las nanopartículas y las posibles interferencias en ensayos bioanalíticos. Adaptada de referencia.<sup>334</sup>

Se pueden encontrar diversos estudios que demuestran estas interferencias en ensayos de viabilidad celular debido a partículas de dióxido de titanio, carbón y óxido de cinc, entre otras.<sup>335,336</sup> Aunque es importante destacar que como se puede observar en la Figura A.2, estas propiedades no solo deben tenerse en cuenta en ensayos de viabilidad celular, sino que pueden afectar a otros ensayos bioanalíticos, algunos de los cuales serán comentados en detalle en los siguientes apartados.

### A.2.3. Citometría de flujo para la evaluación de diferentes parámetros celulares

La **citometría de flujo**<sup>337,338</sup> (FC, flow cytometry) es una técnica de análisis celular que inicialmente nació para la clasificación de células pero que con el paso del tiempo se ha convertido en una herramienta para analizar cualquier parámetro celular, siempre que exista una propiedad física medible o un trazador bioquímico. Los citómetros de flujo constan de un sistema hidráulico para la introducción de la muestra en suspensión, de tal forma que se consigue un flujo constante de células individuales que pasan a través de un haz de luz láser. La luz dispersada por las células a su paso es recogida por diversos detectores, uno situado a ángulos bajos con respecto al haz de luz, que detecta la dispersión denominada *forward scatter* (FSC), y el otro colocado en ángulo recto con respecto al haz, que recoge la dispersión denominada *side scatter* (SSC). Es importante destacar que FSC y SSC proporcionan distinto tipo de información. Mientras que la FSC da una idea del tamaño de las células, la SSC indica la complejidad de las mismas. En ambos casos se evalúan características morfológicas mediante la dispersión de la luz, pero esta técnica permite a su vez analizar características antigénicas mediante la señal de fluorescencia. Para este último caso se emplean fluoróforos que pueden emitir luz (a una frecuencia más baja que la fuente) tras la excitación de los mismos. Por lo tanto, los detectores pueden recoger una combinación de la luz difusa y fluorescente, tras

filtraciones con espejos dicróicos, para aislar las longitudes de onda de interés. Todo el sistema de un citómetro de flujo viene representado en la Figura A.3.



*Figura A.3. Esquema de los componentes de un citómetro de flujo.*

Las ventajas que presenta esta técnica son el análisis de un número significativo de células, la posibilidad de medir células individuales y la versatilidad para emplear múltiples marcajes en una sola célula con el objetivo de evaluar diferentes parámetros. Así, se pueden encontrar estudios mediante el empleo de la citometría de flujo para evaluar el grado de apoptosis, el contenido de ADN que proporciona información sobre el ciclo celular, así como el grado de internalización de partículas marcadas con fluoróforos. Sin embargo, presenta también alguna desventaja, ya que la información sobre la morfología celular es escasa y es incapaz de proporcionar información sobre la localización del analito.

La **apoptosis** es un proceso de muerte celular que supone diversos cambios morfológicos y bioquímicos en las células. En una de las primeras etapas de dicha muerte, se activan una serie de proteínas denominadas caspasas que se asocian con una pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Este hecho puede evaluarse mediante el empleo de un marcador fluorescente, el JC-1, el cual es permeable a las membranas de las mitocondrias produciéndose una acumulación dependiente del potencial, que puede registrarse por el desplazamiento de la emisión fluorescente desde los 530 nm (verde) a los 590 nm (rojo). Por tanto, la pérdida del potencial de membrana supone una reducción de la señal en la región del rojo con un incremento en la señal verde, debida a la menor acumulación del colorante.

Otra de las características importantes de las células apoptóticas que puede ser analizada mediante citometría de flujo, es el cambio producido en la membrana plasmática. Este hecho supone la traslocación de la fosfatidilserina (PS) desde la parte interna de la membrana plasmática a la región externa, de tal forma que dicha proteína se muestra expuesta al entorno celular externo. Mediante el empleo de la Anexina-V marcada con un fluoróforo, como el

isocianato de fluoresceína (FITC), podemos identificar selectivamente las células apoptóticas por unión de dicha PS externalizada con la anexina. Generalmente la Anexina V-FITC se usa junto con el yoduro de propidio (IP). Este compuesto es un agente intercalante fluorescente, el cual se une estequiométricamente con los ácidos nucleicos, pero únicamente de las células que presentan la membrana afectada, lo que es característico de las células en apoptosis tardía o necrosis.

La **progresión del ciclo celular** y los porcentajes de células en las distintas fases del mismo puede evaluarse mediante citometría de flujo haciendo uso de agentes de tinción de ADN. Entre estos agentes podemos encontrar los que se intercalan con los ácidos nucleicos, como el yoduro de propidio, o los que presentan afinidad con las regiones ricas en adenina y timina (A-T), como el reactivo Hoechst. En el primer caso, se debe tener en cuenta que, puesto que dicho colorante tiñe todos los ácidos nucleicos, se deben incubar las células junto con una RNasa para evitar la tinción del RNA. Además, otra de las diferencias con respecto al Hoechst, es que el yoduro de propidio no es un colorante permeable por lo que primero se deben fijar las células y permeabilizar la membrana de las mismas para su tinción<sup>339</sup>. Los agentes fluorescentes empleados se intercalan estequiométricamente con el ADN, de tal manera que la cantidad de tinte será proporcional al contenido del mismo. Habitualmente en este tipo de análisis se realizan registros de en torno a 1000 células por segundo para obtener buenas señales de fluorescencia y evitar interpretaciones erróneas<sup>340</sup>.

Los agentes fluorescentes empleados se intercalan estequiométricamente con el ADN, de tal manera que, la cantidad de tinte será proporcional al contenido de ADN. Habitualmente en este tipo de análisis se realizan registros de en torno a 1000 células por segundo para obtener buenas señales de fluorescencia y evitar interpretaciones erróneas<sup>340</sup>.

La determinación del contenido de ADN celular permite identificar la distribución de las células a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular.<sup>340,341</sup> En éste se pueden diferenciar cuatro fases (Figura A.4): fase G1, fase S (fase de síntesis de ADN), fase G2 y fase M (mitosis). La relación del histograma de cantidad de ADN con la fase del ciclo celular en la que se encuentra la célula se muestra en la Figura A.4. Teóricamente, las fases G0 y G1 poseen una cantidad de ADN que podríamos denominarla 2C y se diferencia de las fases G2 y M porque en éstas el contenido es el doble (4C); así, en la fase S el contenido de ADN se encuentra entre 2C y 4C.<sup>342</sup> Es por ello que mediante esta técnica bioanalítica no podemos diferenciar entre la fase G0 y G1 o entre la fase G2 y la M.

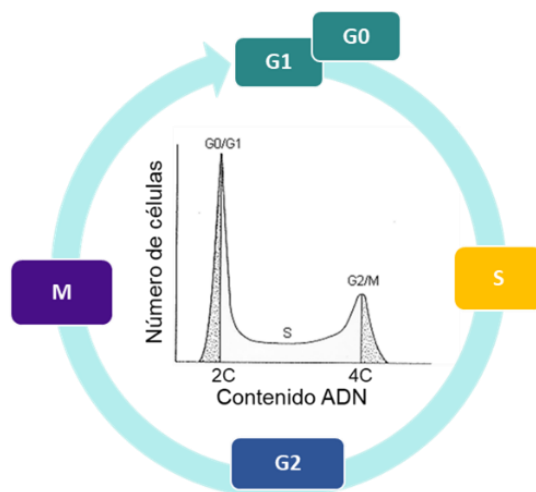


Figura A.4. Relación de las fases del ciclo celular (G0, G1, S, G2, M) con el histograma de ADN.

La deconvolución de los histogramas de ADN mediante software informático permite obtener los porcentajes de distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular. Generalmente, en un grupo de células que no presentan alteraciones en el ciclo celular, el patrón muestra un elevado porcentaje en la fase G0-G1. Sin embargo, cuando existe algún tipo de alteración en el ciclo debido a agentes externos, o incluso por ciertas características celulares, como en el caso de las células tumorales, se pueden observar cambios en los histogramas de ADN. La exposición a nanopartículas puede ser un factor que determina cambios en el patrón del ciclo celular.<sup>236</sup> Algunos estudios con nanopartículas de plata <sup>343</sup> o de dióxido de titanio <sup>344</sup> muestran las alteraciones en el porcentaje de células en las fases G2-M debido al efecto de este agente externo. Así mismo, los análisis de contenido de ADN de células tumorales dan idea del contenido anormal de ADN en este tipo de células y puede ser empleado en diagnóstico o incluso como un valor para el pronóstico en ciertos tipos de tumores.<sup>342</sup>

La **internalización de partículas marcadas con fluoróforos** es otro de los parámetros que puede ser analizado mediante citometría de flujo.<sup>345</sup> En este caso, se pueden detectar y cuantificar el número de células que dan señal en el canal del fluoróforo empleado en el marcaje de las partículas. La presente Tesis muestra dichos análisis con el empleo de FITC para el marcaje fluorescente de los nanopartículas de sílice mesoporosa. De esta forma se puede evaluar la internalización selectiva de materiales con agentes de vectorización, o la dependencia de la internalización con respecto al tiempo de exposición o la concentración de los materiales empleados. En este punto, es importante destacar que la fluorescencia de las partículas que pueden quedar adheridas a la superficie celular, se quenchea mediante la adición de azul de tripano, analizando, por tanto, únicamente la fluorescencia que emiten las partículas intracelulares.<sup>346,347</sup>

#### A.2.4. Empleo de técnicas microscópicas para el estudio de interacciones nanomaterial-célula

Cuando se habla de estudios de interacciones de nanomateriales con células es importante destacar que existen numerosos parámetros que presentan un papel clave en este proceso. Principalmente, los efectos producidos en las células van a ser dependientes de la concentración y del tiempo de exposición a los materiales. En este punto, las técnicas microscópicas nos pueden aportar amplia información sobre los cambios morfológicos, la internalización y la localización de los materiales en el interior celular.

Para la evaluación de las **alteraciones en la morfología celular** tras la exposición de las células a los materiales, la microscopía de contraste de fases aparece como la técnica más empleada gracias a que permite la visualización de células en su estado natural, sin necesidad de etapas previas de fijación y deshidratación.<sup>244</sup>

Sin embargo, para conocer en profundidad las interacciones de las partículas con las células, es necesario obtener mayor información sobre los materiales internalizados. En este punto, se puede hacer uso, como se ha comentado en el apartado anterior, de la citometría de flujo siempre que las partículas presenten un fluoróforo que permita su seguimiento y conocer así el grado de internalización. Sin embargo, en el caso de nanomateriales metálicos o sin marcaje fluorescente, este estudio requiere del uso de técnicas microscópicas ya que, además de ofrecernos información sobre el tamaño y forma de los nanomateriales, o sobre cambios en su morfología y dispersión, nos permite conocer su **localización en el interior celular**.

A la hora de llevar a cabo este tipo de estudios, destaca la microscopía electrónica de transmisión (TEM) como técnica más adecuada; aunque requiere la elaboración de un protocolo para el tratamiento de las muestras. Uno de los factores importantes en dicho proceso es la selección de agentes fijadores adecuados. Los más habituales son los aldehídos (glutaraldehído y formaldehído) y el tetraóxido de osmio<sup>348</sup>. Los aldehídos permiten preservar la estructura celular debido a que reaccionan con aminas y aminoácidos (lisina y arginina) generando proteínas reticuladas. Sin embargo, es necesario el uso de otro agente fijador como el tetraóxido de osmio, ya que los aldehídos no reaccionan con los lípidos de la membrana celular y se pueden producir problemas en la etapa de fijación. El tetraóxido de osmio es capaz de reaccionar con algunas proteínas a la vez que con lípidos insaturados estabilizando las membranas celulares y, además, añade densidad electrónica lo que permite mejorar el contraste.

Por otro lado, es importante seleccionar el tampón en el cual se lleva a cabo la fijación. En todo el proceso es importante mantener la célula en su estado fisiológico, por lo que el tampón más empleado es el fosfato salino (PBS). Hay que destacar que el uso de tampones que

contengan grupos amino pueden reaccionar con las moléculas fijadoras por lo que debe evitarse su uso, para no afectar al proceso de fijación de las células.

Finalmente, para observar las muestras en el microscopio electrónico de transmisión se requiere de una etapa de deshidratación de las mismas, para posteriormente embeber las muestras en una resina que permita la realización de cortes ultrafinos mediante el uso del ultramicrotomo.

Este tipo de técnica puede combinarse con sistemas criogénicos que facilitan el análisis de muestras biológicas reduciendo así los procedimientos de preparación de las mismas. Una de las más empleadas es la técnica de criomicroscopía electrónica (CryoEM)<sup>349,350</sup> que permite observar sistemas biológicos en su entorno nativo, lo que supone una alteración mínima de la morfología de los mismos.

### A.2.5. Análisis de expresión génica

El estudio de la expresión génica es un campo de especial interés en evaluaciones citotóxicas de materiales, desarrollo de nuevas aplicaciones o en evaluaciones clínicas, entre otros. Dentro de las técnicas empleadas en este campo podemos encontrar: **Northern blot**, **microarrays**, **hibridación in-situ**, **qPCR** y **qRT-PCR**.

Los ensayos *Northern* (**Northern blot**)<sup>351,352</sup> se basan en la detección de una secuencia específica de ARN dentro de una mezcla compleja de ARN, empleando una metodología similar al método desarrollado para ADN denominado *Southern blot*.<sup>353</sup> El primer paso en un ensayo de este tipo es la extracción y aislamiento del ARN de las células o tejidos. Posteriormente, dicho ARN se desnaturaliza con calor para romper su estructura secundaria y proceder a la separación por tamaños mediante un proceso de electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes. La separación del ARN se transfiere a una membrana sobre la cual se realiza un proceso de hibridación con una sonda de ARN marcada. En función del marcaje de la sonda empleada se detectará una señal diferente, por ejemplo, colorimétrica o quimioluminiscente. Este ensayo se emplea tanto a nivel cualitativo como cuantitativo para realizar estudios sobre los niveles de expresión de un gen de interés en células, tejidos u organismos. Sin embargo, es importante destacar que se requiere una normalización para poder comparar los resultados obtenidos en diversas muestras y en distintos ensayos. Por ello, cuando se habla de cuantificación, en este tipo de ensayos, se trata de una cuantificación relativa frente a los niveles de un gen que se exprese uniformemente en todas las muestras. Generalmente se seleccionan para este propósito los denominados “genes housekeepers” como la actina, la aldolasa o la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GADPH).

Los ensayos *Northern* presentan algunas limitaciones<sup>354</sup> entre las que se pueden encontrar: el tamaño de la muestra de ARN que se quiere detectar, ya que la sensibilidad se encuentra en torno a 10-30 µg de ARN total; la interpretación de los resultados cuando la sonda de ARN empleada puede hibridar con otros fragmentos de ARN similares al de interés; o la dificultad de automatización del proceso. Por ello este método tradicional se encuentra cada vez más en desuso frente a los nuevos métodos que se comentan a continuación.

A finales de los años 80 surgió la idea del análisis de diversos genes de una misma muestra en un solo ensayo, dando lugar al nacimiento de otra de las metodologías empleadas para el estudio de expresión génica conocida como **microarrays**<sup>355,356</sup>. A diferencia del ensayo descrito anteriormente, en los microarrays las sondas se encuentran depositadas en una superficie y no presentan marcaje. Por lo que en este caso, el ARN de la muestra biológica a analizar se marca previamente mediante una transcripción reversa, en presencia de nucleótidos fluorescentes, obteniendo así el correspondiente cDNA marcado. Este cDNA sufre el proceso de hibridación con las sondas y da lugar a la señal fluorescente correspondiente con la expresión de los genes analizados.

Este método permite, además, realizar estudios de expresión diferencial empleando simultáneamente dos marcajes fluorescentes. De esta forma, con el análisis de un solo microarray se evitan las complicaciones en la comparativa de estudios realizados mediante diferentes procesos de hibridación, como puede ocurrir cuando se emplea el ensayo *Northern Blot*. Por ello, algunas de las aplicaciones más extendidas de los microarrays están relacionadas con su uso en clínica para la identificación de cambios en la expresión de ciertos genes ocasionados por tratamientos con fármacos u hormonas, o para el diagnóstico de enfermedades.

La **hibridación *in situ***<sup>357,358</sup> es una técnica para determinar la presencia o ausencia de una secuencia de ADN o ARN de interés, así como para localizar dicha secuencia en células o sitios cromosómicos específicos. La información espacial que aporta esta técnica la hace interesante en campos como mapeo de genes, infecciones virales, expresión génica o diagnóstico prenatal, entre otros. Las bases de esta técnica son semejantes a las descritas en los ensayos *Northern blot*, pero en este caso la hibridación de la sonda marcada se realiza directamente sobre las células o los tejidos de interés, previamente fijados o congelados con el fin de preservar los ácidos nucleicos. Las sondas empleadas en este caso pueden ser de ADN, tanto de cadena doble como simple, de ARN (ribosondas) o de oligonucleótidos sintéticos. Generalmente, las ribosondas son las empleadas en estudios de expresión génica. Además, existen diferentes marcajes con isótopos radioactivos o con moléculas fluorescentes que determinarán el modo de detección de la señal correspondiente<sup>358</sup>.



Una de las principales ventajas de esta técnica es la posibilidad de usar al máximo un mismo tejido para numerosos análisis, lo que permite también estudios exhaustivos de tejidos o células que son difíciles de aislar. Por el contrario, una desventaja de la aplicación de la hibridación *in situ* es la dificultad de identificar ciertos genes que tienen pocas copias de ADN o ARN. Por ello, se han realizado distintas modificaciones para aumentar la sensibilidad mediante amplificaciones previas de la secuencia de ácidos nucleicos de interés. Para este propósito se emplea la denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR es una técnica que permite la amplificación de una secuencia específica de ácidos nucleicos catalizada por enzimas.<sup>359,360</sup> En dicho proceso intervienen dos cebadores, que son complementarios a la región terminal del fragmento de ácido nucleico de interés, la enzima ADN polimerasa, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), el ADN plantilla, es decir, la secuencia a amplificar, y un tampón para mantener el pH adecuado y suministrar iones necesarios para la reacción tales como el  $Mg^{2+}$ . La reacción tiene lugar en tres etapas a diferentes temperaturas (Figura A.5):

- 1ª etapa: Desnaturalización del ADN. En esta etapa el ADN de doble cadena (dsADN) se desnaturaliza dando lugar a ADN de cadena simple (ssADN) por ruptura de los enlaces de hidrógeno que existen entre las bases que conforman la estructura. Esta etapa se lleva a cabo a 90-95°C, temperatura a la cual la enzima polimerasa está inactiva.
- 2ª etapa: Hibridación del cebador. Los cebadores, que se encuentran en exceso en la reacción, se alinean e hibridan con la región complementaria del ADN de cadena simple a una temperatura entre 50-60°C. La selección de esta temperatura viene condicionada por la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los cebadores elegidos, generalmente se selecciona una  $T^a$  de hibridación 5 °C por debajo de la  $T_m$  de los cebadores. Los cebadores son secuencias de entre 10 y 30 bases que se unen específicamente a la región 3' terminal de la cadena del ADN de interés.
- 3ª etapa. Extensión o elongación de la cadena. En esta etapa final se produce la elongación del cebador por incorporación de nucleótidos complementarios a la cadena de ADN inicial. Este proceso es catalizado por la enzima ADN polimerasa desde el terminal 3' hasta el 5', y generalmente se lleva a cabo a 72 °C. La reacción se finaliza cuando se termina la construcción de la hebra de ADN complementaria a la plantilla.

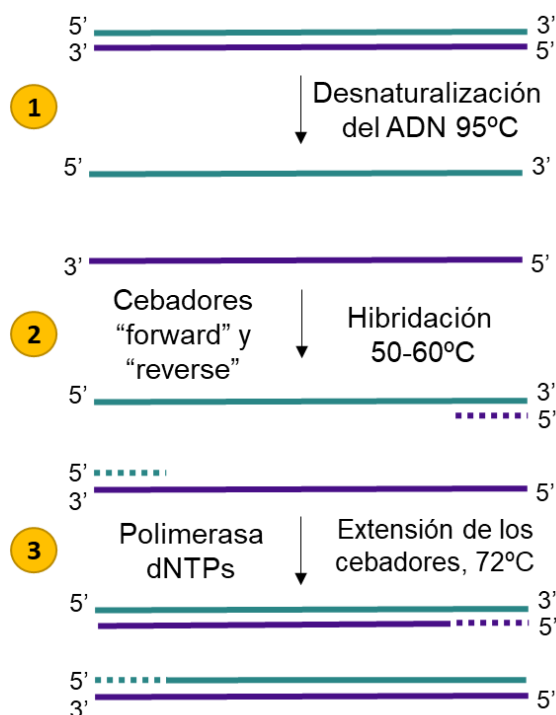


Figura A.5. Etapas de la PCR. Desnaturalización del ADN (1). Hibridación de los cebadores (2). Extensión de los cebadores (3).

Las tres etapas descritas anteriormente constituyen un ciclo. Generalmente un proceso de amplificación por PCR conlleva de 20 a 40 ciclos. Teóricamente, el número de moléculas de ADN al final de la reacción ( $N_m$ ) depende del número inicial de copias de ADN ( $N_0$ ) en la mezcla de reacción y del número de ciclos llevados a cabo,  $n$ . Y puede predecirse a través de la siguiente ecuación:

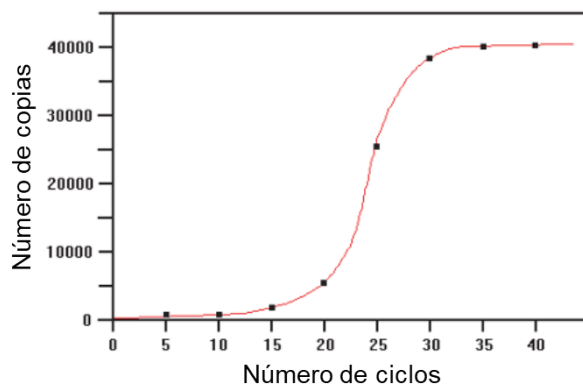
$$N_m = N_0 \cdot 2^n$$

Sin embargo, debido a que el proceso de amplificación presenta ciertos factores limitantes, esta cantidad, en la práctica, se aproxima a la siguiente ecuación:

$$N_m = N_0 \cdot (1 + x)^n$$

En donde  $x$  es la efectividad o rendimiento de la reacción, que puede tomar valores entre 0 y 1 o puede expresarse en valores de porcentaje. Incluyendo este nuevo factor se tienen en cuenta las limitaciones y aspectos que afectan a los ciclos de PCR. Además de la efectividad hay otros factores que determinan la eficacia de una PCR como la especificidad, es decir, que en una reacción se obtenga solo una secuencia de interés y la fidelidad, lo que implica que haya un número insignificante de errores introducidos en la secuencia producto originados por la enzima polimerasa.

El proceso de amplificación completo descrito anteriormente, se realiza habitualmente con una sección del ADN de interés. Así, la amplificación de ese fragmento se lleva a cabo en tres fases (Figura A.6): una fase inicial en la cual no se llegan a obtener fragmentos de ADN de la longitud objetivo, a continuación, una fase exponencial de crecimiento, y finalmente una fase estacionaria donde los ciclos continuados ya no dan cantidades significativas de producto.



*Figura A.6. Perfil de amplificación de la PCR donde se puede ver la fase inicial, la fase de amplificación exponencial y la fase estacionaria.*

Junto con la aplicación de esta reacción como mejora de las limitaciones que presentaba la hibridación in situ se puede encontrar su aplicación en análisis cuantitativo de expresión génica. En este caso se conoce como PCR en tiempo real o **PCR cuantitativa (qPCR)**.<sup>361,362</sup>

La **qPCR** es una técnica que emplea la reacción de la polimerasa para la amplificación de un fragmento de ADN que puede ser detectado simultáneamente. Habitualmente la detección de los productos de la PCR se lleva a cabo gracias a un marcador fluorescente, de tal forma que un aumento en la fluorescencia corresponde con un incremento de los productos amplificados en cada ciclo. Existen dos tipos de experimentos basadas en esta técnica:

- Ensayos basados en fluorocromos de unión a dsADN: Los fluorocromos de unión son pequeñas moléculas que emiten fluorescencia cuando se unen a ADN de doble cadena (Figura A.7). Durante la amplificación por PCR la unión de dichos fluorocromos a las grandes cantidades de dsADN que se producen permiten registrar el aumento de la fluorescencia. Por ello, es importante destacar que para que un fluoróforo sea adecuado, debe mostrar el incremento de la fluorescencia cuando se une al ADN y no debe inhibir la PCR. Dentro de los fluorocromos empleados para este tipo de ensayos se pueden diferenciar los intercalantes, los cuales se unen entre las dos hebras de ADN, o los de unión al surco menor que se caracterizan por enlazarse externamente al ADN de doble cadena. Uno de los fluorocromos más empleados es el denominado SYBR Green.

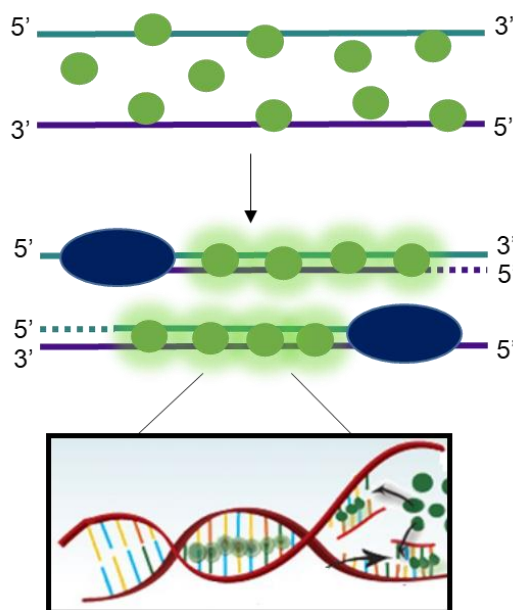


Figura A.7. Mecanismo de marcaje con fluorocromos de unión al ADN en qPCR.

Una de las ventajas de este método es su versatilidad, al ofrecer la posibilidad de emplear el mismo fluorocromo para la detección de cualquier secuencia de ADN. Por el contrario, estos fluorocromos no distinguen entre ADN específico y otros productos no específicos de la reacción, por lo que se puede registrar señal de fluorescencia originada por dímeros de los cebadores o errores de amplificación que sobreestiman la cuantificación de la secuencia de interés.

- Ensayos basados en sondas específicas: Estos ensayos se basan en la degradación de una sonda por la actividad 5'-3' exonucleasa de la enzima ADN polimerasa (Figura A.8). La sonda es un oligonucleótido corto que es complementario a una región de la secuencia de interés localizada entre los dos cebadores. Además, esta sonda presenta una molécula fluorescente (*reporter*) unida al extremo 5' y un *quencher* en el extremo 3'. Al inicio de la PCR, la sonda se hibrida con la región complementaria de la hebra molde de ADN tras la desnaturalización del mismo. En este punto la proximidad del fluoróforo y del quencher previenen la detección de la señal de fluorescencia debido a la transferencia de energía de resonancia (FRET). Cuando la polimerasa replica la hebra molde de ADN, el fluoróforo se separa de la sonda debido a la actividad exonucleasa de la enzima emitiendo así fluorescencia. Esta emisión aumenta con los ciclos de amplificación de tal forma que la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional al número de veces que se repite el proceso, es decir, al número de moléculas amplificadas. Una de las sondas más empleadas en este tipo de ensayos son las denominadas TaqMan.

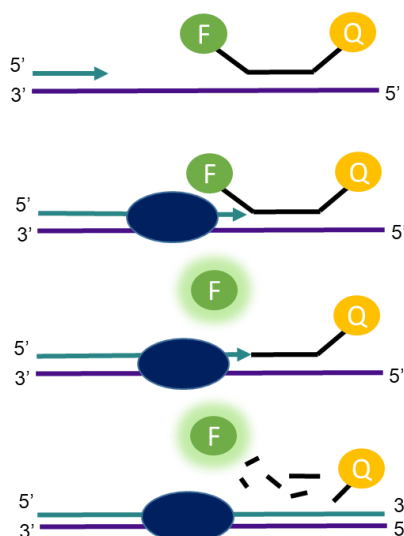


Figura A.8. Mecanismo de marcaje con sondas en qPCR.

La ventaja que ofrece este método es que se detectan únicamente productos específicos de la amplificación y por lo tanto no requiere prácticamente procesos de optimización. Además, empleando múltiples sondas con diferentes fluoróforos se pueden realizar detecciones simultáneas de diferentes secuencias. Sin embargo, los costes asociados a este método son superiores a los que se encuentran en un método con fluorocromos inespecíficos.

A menudo en los análisis de expresión génica, se parte del ARN de una muestra. De tal forma que, puesto que la reacción PCR no puede emplear ARN como molde para la amplificación, se debe introducir una reacción enzimática previa al proceso de qPCR. Esta modificación se conoce como **PCR con transcriptasa inversa (RT-qPCR)**. En este caso, previa a la PCR, se lleva a cabo una transcripción del ARNm extraído de la muestra de interés, a ADN complementario de cadena simple (cADN) mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa (Figura A.9). Esta reacción puede llevarse a cabo en el mismo paso en el que sucede la PCR en tiempo real simplificando así el proceso, y reduciendo posibilidades de contaminación. El proceso se llama entonces, **RT-qPCR en un paso**. En este caso se requieren cebadores reversos específicos de un gen (GSP) ya que el uso de oligo (dT) o cebadores aleatorios puede dar lugar a productos no específicos. El uso de estos últimos cebadores se presenta en la **RT-qPCR en dos pasos**, en la cual se produce la transcripción reversa en primer lugar, y el cADN obtenido sirve luego como molde para la PCR. Es importante destacar que, en el proceso de la retrotranscripción, la enzima transcriptasa también tiene actividad RNasa H, lo que permite la degradación del RNA molde empleado en la síntesis de cDNA. Por tanto, éste se encuentra libre y sin impurezas de otros ácidos nucleicos para el proceso de la qPCR.

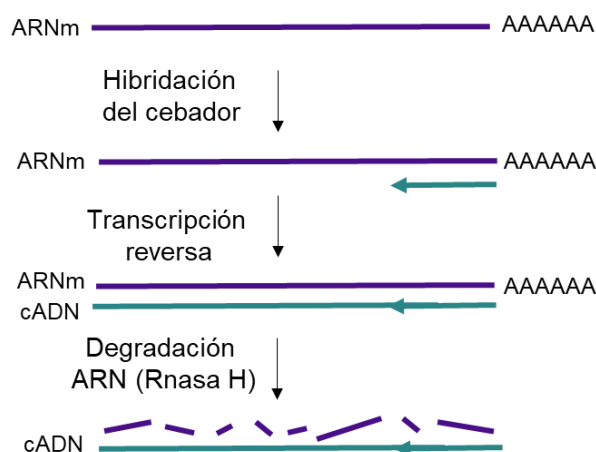


Figura A.9. Transcripción reversa del ARNm en cADN.

En la presente Tesis Doctoral se muestran análisis de expresión génica llevados a cabo mediante RT-qPCR. En este punto es importante destacar algunos conceptos que se emplean en la interpretación de los perfiles de amplificación obtenidos. Como los resumidos en la Figura A.10 y que se describen a continuación:

- **Línea base:** Se refiere al nivel de señal de fluorescencia durante los ciclos iniciales de la PCR, generalmente entre el 3 y el 15, en los cuales no hay prácticamente cambios en la señal de fluorescencia. Esta señal se toma como fondo de la reacción PCR y habitualmente se define experimentalmente, pudiendo ser diferente entre genes. Siempre se debe tomar la misma línea base para la comparación de un mismo gen entre diferentes experimentos.
- **Umbral o "threshold":** Es el nivel de señal que refleja un aumento estadísticamente significativo sobre la línea base. Los programas de tratamiento de datos muestran un umbral automático, pero siempre puede ser modificado dentro de la fase exponencial para distinguir una señal de amplificación relevante frente al fondo.
- **C<sub>t</sub> (ciclo "threshold"):** Es el ciclo al cual la señal de fluorescencia de la reacción se cruza con el umbral establecido.

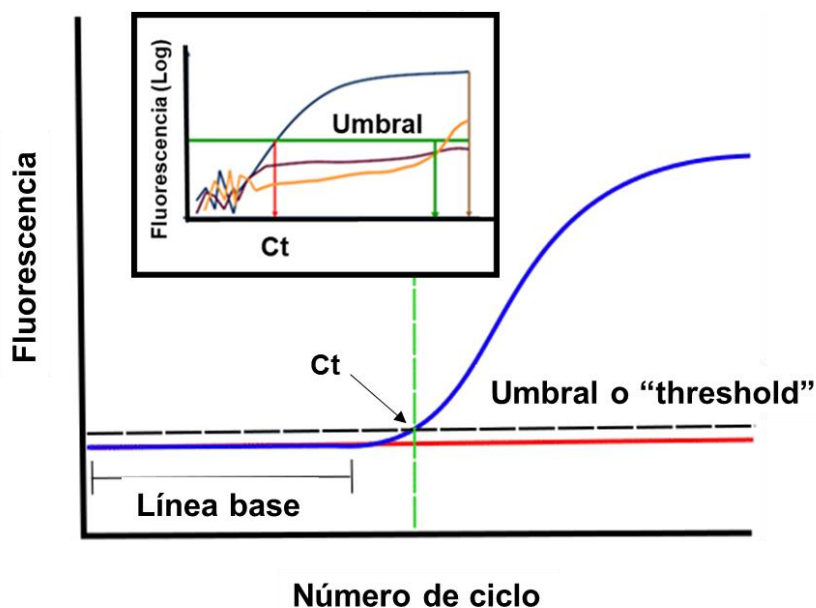


Figura A.10. Parámetros del perfil de amplificación en escala lineal y en escala logarítmica (inset).

Dentro de esta técnica cuantitativa se pueden encontrar dos estrategias de cuantificación<sup>361,363</sup>:

- **Cuantificación absoluta:** Este método implica la preparación de diluciones seriadas de ADN o ARNm, partiendo de una concentración inicial conocida. Tras la amplificación por qPCR de cada una de ellas se construye una recta de calibrado con las concentraciones y los valores de  $C_t$  obtenidos en cada caso. La cuantificación de la muestra problema se realiza mediante la curva de calibrado y el valor  $C_t$  obtenido para la misma.
- **Cuantificación relativa:** En este caso se determinan cambios en los niveles de expresión del ARNm de un gen entre una muestra objeto de estudio (por ejemplo, células tratadas con nanopartículas o células enfermas) y otra considerada como un calibrante (células sin tratar o sanas). Este método es el más utilizado en estudios de expresión génica y es, por tanto, el que se mostrará para la cuantificación y discusión de los ensayos realizados en la presente Tesis.

#### A.2.6. Análisis de expresión proteica

Junto con los estudios de expresión génica comentados anteriormente, también es importante destacar la posibilidad que ofrecen los ensayos de expresión proteica para obtener información en estudios toxicológicos, en respuestas a tratamientos o en aplicaciones de nuevos nanomateriales en biomedicina. Principalmente, estos estudios se basan en **inmunoensayos**, en los cuales se produce un reconocimiento entre el anticuerpo (*Ab*) y el

antígeno (*Ag*) dando lugar a la generación de una señal detectable. Este proceso se lleva a cabo gracias a la presencia de sitios de unión en ambas moléculas denominados paratopo, en el caso del anticuerpo y epítipo en el del antígeno. Cuando los dos sitios de unión se enlazan dan lugar al complejo anticuerpo - antígeno (*Ab-Ag*) tal y como se muestra en la Figura A.11.

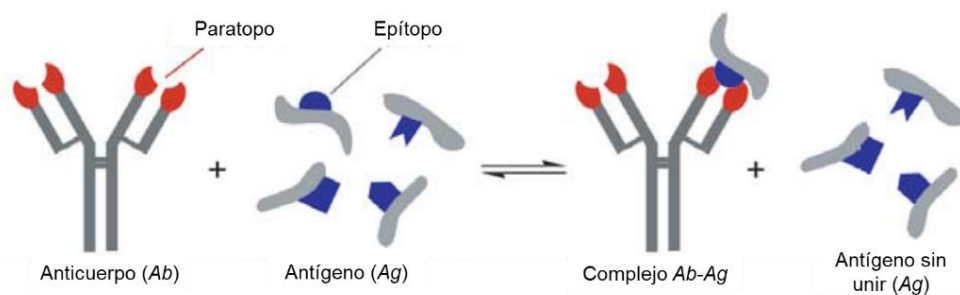


Figura A.11. Reconocimiento molecular entre el paratopo del anticuerpo y el epítipo del antígeno para la formación del complejo *Ab-Ag*. Adaptada de referencia. <sup>362</sup>

La formación de este complejo solo se lleva a cabo con el antígeno específico para ese anticuerpo, incluso a bajas concentraciones del mismo. Por ello, este tipo de ensayos presentan elevada sensibilidad y bajos límites de detección.

Para detectar la señal correspondiente al complejo formado se precisa de un marcaje, el cual puede encontrarse en el antígeno o en el anticuerpo. Ese marcaje puede ser fluorescente, luminiscente, radioactivo o una enzima o grupo electroquímicamente activo.

Basados en este principio de reconocimiento, en la presente Tesis Doctoral se muestran ensayos **Western Blot**, que combinan las bases del inmunoensayo con electroforesis en gel, y los ensayos **ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)** empleados para la cuantificación de ciertas proteínas de interés.

- Ensayos **Western Blot**:

Los ensayos *Western (Western Blot)*<sup>364–366</sup> se basan en la separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), su posterior transferencia e inmovilización a un soporte de membrana, y su detección selectiva mediante un sistema mediado por anticuerpos. El primer paso basado en la electroforesis en gel permite la separación de proteínas en mezclas complejas para su correcta visualización. Este proceso de electroforesis se puede definir como el movimiento de partículas o moléculas cargadas eléctricamente en un medio conductor bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado. El medio conductor es generalmente un tampón acuoso, también conocido como electrolito o tampón de electroforesis. Las moléculas se



separan en función de su movilidad electroforética, la cual es un parámetro que describe relaciones entre la carga y el tamaño de las moléculas.

En la **electroforesis en gel** la separación tiene lugar en un medio eléctricamente no conductor como la agarosa o la poliacrilamida (PA) que contiene un tampón electrolítico. Los poros del gel funcionan como un tamiz molecular. Existen dos formas de separación en este caso<sup>359</sup>: electroforesis en gel nativo (PAGE nativa) donde los analitos cargados se distinguen según su movilidad y su tamaño y, por otro lado, la **electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)**, donde los analitos presentan la misma relación carga/tamaño y por ello se separan únicamente por tamaños. En la presente Tesis, el empleo de la técnica de electroforesis se ha centrado en este último modo de separación, por lo que a continuación se detallarán algunos de los principios y conceptos importantes de la misma.

En la SDS-PAGE (Figura A.12), el detergente aniónico SDS desnaturaliza las proteínas uniéndose en una proporción constante de 1.4 g de SDS por 1 g de proteína; es decir, aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos. Los complejos formados presentan la gran carga negativa del SDS que enmascara la carga intrínseca de las proteínas, de modo que todas las proteínas tratadas tienen una carga neta constante por unidad de masa. Por ello, todas presentan la misma movilidad electroforética y la separación depende, únicamente, del efecto de cribado molecular de los poros del gel. Así, cuanto más grande es el peso molecular de la proteína, más lentamente migra. Para la preparación de la muestra se emplea un exceso de SDS y un agente reductor de tiol como el mercaptoetanol o el DTT, que al calentarse a 95 °C junto con las proteínas permiten la desnaturalización de las mismas: la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas se pierde, el agente reductor de tiol actúa rompiendo los puentes disulfuro y el SDS aporta las cargas negativas.

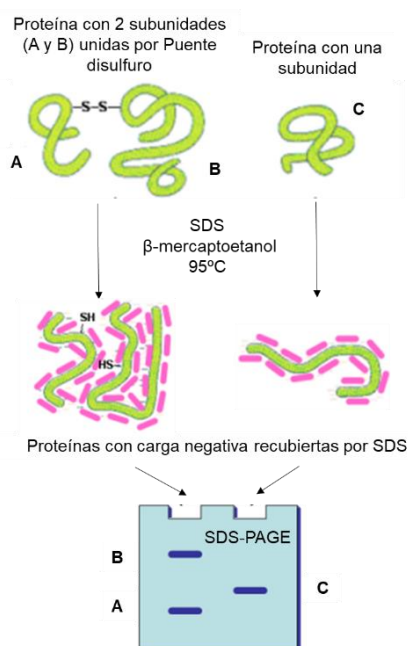


Figura A.12. Desnaturalización de las proteínas en SDS-PAGE y separación electroforética en función de los tamaños.

Uno de los aspectos importantes en la separación mediante SDS-PAGE es la composición del gel empleado en el proceso de separación, ya que como se ha comentado anteriormente, el tamaño del poro influirá de forma directa en la separación de las proteínas. Las propiedades de tamizado molecular del gel vienen determinadas por dos factores: la concentración total de acrilamida (%T; siendo T la concentración total de monómeros de acrilamida y bisacrilamida) y la cantidad del agente reticulador (%C). Por tanto, los tamaños de poro disminuyen cuando aumenta %T. Generalmente se emplean valores de %T entre 5% y 20%. Aunque es importante destacar que los compuestos de alto peso molecular, con MW > 800 kDa, no se pueden utilizar en geles de PA, ya que el tamaño de los poros, incluso con valores bajos de T%, no es lo suficientemente grande. En cuanto al %C, cualquier incremento o disminución aumenta el tamaño de poro, ya que sigue una función parabólica. Este factor de la composición del gel es de gran importancia en un ensayo *Western Blot* ya que se debe seleccionar el %T que se adecue para obtener la mejor separación en la región de pesos moleculares de la proteína de interés, con el fin de conseguir la banda de dicha proteína sin interferencias o solapamientos con otras proteínas similares en tamaño, en la medida de lo posible.

Los geles de PA presentan dos zonas diferentes, el denominado gel de apilamiento o espaciador (*stacking gel*) y el gel de resolución o separador (*running gel*). El primero de ellos presenta un tamaño de poro grande (4%T) y está preparado para concentrar las proteínas gracias a las condiciones de pH del tampón Tris/HCl que se emplea (pH 6.8). El segundo gel presenta un poro inferior (5-20%T) y se prepara habitualmente empleando un tampón Tri/HCl

a pH 8,8 permitiendo que las macromoléculas se separen de acuerdo a su tamaño. En función del gel de resolución se puede conseguir un intervalo óptimo de separación. Así, geles de 8%T, 10%T y 12%T se pueden emplear para separar proteínas de 24 a 205 KDa, 14 a 205 KDa y 14 a 66 KDa, respectivamente. A modo general, en este gel todas las proteínas que se encuentran cargadas negativamente, migran hacia el ánodo, pero las moléculas de pequeño tamaño tendrán menos resistencia al desplazamiento por el gel, y por ello tendrán mayor velocidad de migración en comparación con las de elevado tamaño.

Tras la separación de todas las proteínas, el siguiente paso en el estudio de expresión de una proteína específica implica la transferencia e inmovilización a una membrana de nitrocelulosa (NC) o fluoruro de polivinilideno (PVDF).<sup>366,367</sup> Las membranas de nitrocelulosa se utilizan por su alta afinidad con las proteínas y su capacidad de retención. Sin embargo, son quebradizas y no permiten realizar varios ensayos sobre la misma membrana. En este sentido, las membranas de PVDF proporcionan un mejor soporte mecánico y permiten el almacenamiento de la membrana e incluso varios ensayos sobre la misma. Sin embargo, el fondo es más alto en las membranas de PVDF y, por lo tanto, el lavado es un paso determinante. La transferencia de las proteínas es de tipo electroforética y se realiza utilizando un campo eléctrico orientado perpendicularmente a la superficie del gel, haciendo que las proteínas, cargadas negativamente, se muevan fuera del gel hacia la membrana colocada en el electrodo positivo.

Una vez que las proteínas están fijadas en la membrana se procede a la detección de la señal de la proteína objetivo. Es aquí donde se hace uso de los anticuerpos y de los principios de inmunoensayo detallados anteriormente. En primer lugar, se realiza una etapa de bloqueo para saturar todos los sitios restantes de unión a proteínas en la membrana para maximizar la relación señal-ruido específica.<sup>368</sup> Posteriormente, se emplean anticuerpos primarios específicos para el antígeno de interés. Éste puede llevar un marcaje para su detección directa (ensayo directo) o, en el caso de no presentar marcaje, puede detectarse mediante el uso de un anticuerpo secundario específico para la especie del anticuerpo primario (ensayo indirecto) (Figura A.13). El reportero o marcaje conjugado al anticuerpo puede ser, entre otros, una enzima que de lugar a una reacción colorimétrica o una señal luminiscente.<sup>368</sup>

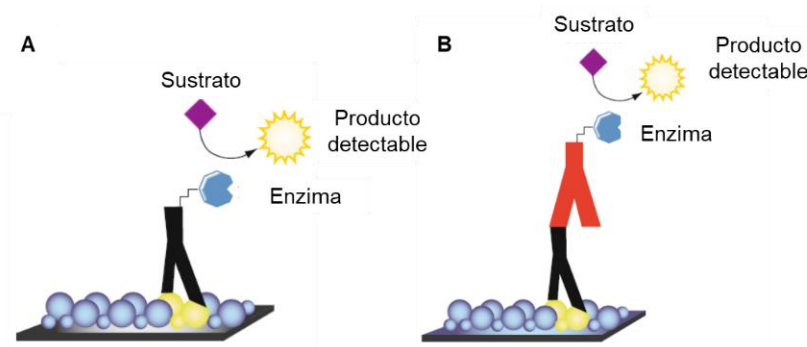


Figura A.13. Esquema de detección directa (A) e indirecta (B) en un ensayo Western Blot. Adaptada de referencia <sup>369</sup>

Uno de los métodos más usados es la detección quimioluminiscente mejorada (ECL).<sup>370</sup> Ésta tiene varias ventajas, incluyendo la capacidad de alcanzar altos niveles de sensibilidad y tiempos de proceso rápidos. El principio de la técnica se basa en la oxidación del luminol por la peroxidasa de rábano picante (HRP) en presencia de peróxido de hidrógeno. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol se encuentra en un estado de excitación, que puede decaer al estado fundamental emitiendo luz (Figura A.14).<sup>368</sup> La presencia de potenciadores fenólicos hace que la emisión de luz aumente al menos 1000 veces más y que disminuya el fondo de luminol.<sup>371,372</sup> La señal puede recogerse en una película de rayos-X o en un equipo de imagen. Los tiempos de exposición típicos para captar la imagen con las señales correspondientes varían de unos pocos segundos a varios minutos, dependiendo de la cantidad de antígeno presente y la concentración de los anticuerpos utilizados.

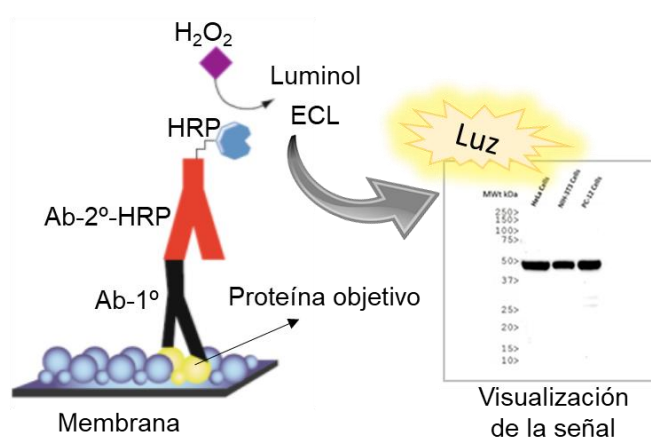


Figura A.14. Esquema del proceso de detección de la señal quimioluminiscente empleando ECL.

Los ensayos *Western Blot* se utilizan habitualmente para identificar cualitativamente una proteína específica de una muestra biológica compleja y proporcionar información sobre su

peso molecular. A nivel cuantitativo, esta técnica puede emplearse para cuantificar relativamente la expresión de una proteína entre muestras con diferentes tratamientos. En el presente documento se mostrarán, por ejemplo, resultados de cuantificaciones relativas entre células tratadas con nanopartículas y células sin tratamiento consideradas como control. En este caso, es importante destacar la necesidad de analizar una proteína que actúe como control interno en todas las muestras y que no debe mostrar diferencias de expresión producidas por el tratamiento de estudio. Al igual que se comentó en el apartado 1.1.4 de análisis de expresión génica, generalmente se emplean como controles internos la tubulina o el GADPH.

- Ensayos **ELISA** (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay):

Los ensayos ELISA<sup>373,374</sup>, descritos por primera vez en 1971, son un método rápido y sensible para la detección y cuantificación de un antígeno utilizando un anticuerpo conjugado con enzimas. Las enzimas empleadas generalmente son la peroxidasa HRP, la fosfatasa alcalina (AP), la  $\beta$ -D-galactosidasa ( $\beta$ -gal) o la  $\beta$ -lactamasa.<sup>375</sup> Además del uso rutinario de laboratorio, este tipo de ensayos se emplean en la industria médica y alimentaria como herramienta de diagnóstico y control de calidad, gracias también a la aplicación de la tecnología para la automatización del proceso. Dependiendo del epítipo del antígeno y de la disponibilidad de anticuerpos específicos, hay diferentes configuraciones: directos, indirectos, sándwich y competitivos.

En los ensayos *ELISA directos*<sup>376,377</sup> se realiza la inmovilización del antígeno de interés en una placa mediante absorción pasiva y se emplea un tampón de bloqueo para saturar todos los sitios de unión no ligados al antígeno. Posteriormente, se lleva a cabo la unión del anticuerpo específico, conjugado con una enzima, con el antígeno. Tras la adición del sustrato necesario para la enzima, se genera una señal que será detectada (Figura A.15). Este tipo de ensayos presentan algunas ventajas, ya que al emplear únicamente anticuerpos primarios se evitan los problemas de reactividad cruzada y los tiempos de ensayos son más cortos.

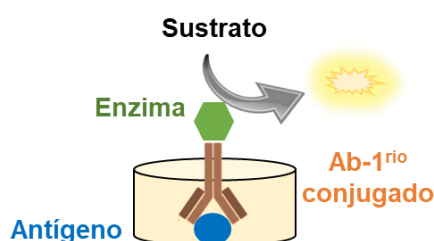


Figura A.15. Esquema de detección mediante ELISA directo.

Los ensayos *ELISA indirectos* surgieron en 1978<sup>378</sup> y se basan en una metodología similar a la de sus predecesores en cuanto a la inmovilización del antígeno y unión del anticuerpo primario. Sin embargo, en este caso se precisa de un anticuerpo secundario que se encuentra conjugado a la enzima (Figura A.16). De esta manera, los ensayos indirectos pueden presentar reactividad cruzada por la presencia de dos anticuerpos, y con ello aumentar la señal de fondo. No obstante, el anticuerpo secundario permite aumentar la señal del anticuerpo primario, por lo que se mejora la sensibilidad con respecto al ensayo ELISA directo.

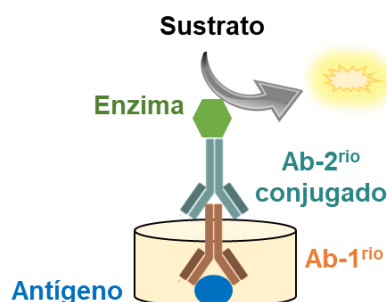


Figura A.16. Esquema de detección mediante ELISA indirecto.

Los ensayos *ELISA tipo sándwich* fueron desarrollados en 1977<sup>379</sup> y se basan en el uso de anticuerpos de captura para la inmovilización del antígeno de interés. La muestra se añade sobre la placa que contiene los antígenos de captura, lo que permite que tras un lavado, solo quede inmovilizado el antígeno objetivo. Para su detección se emplea un anticuerpo primario, que reconoce otro epítipo diferente del antígeno del que ha reconocido el anticuerpo de captura, y un anticuerpo secundario que lleva la enzima conjugada. Al igual que en los casos anteriores, la adición del sustrato provoca la reacción catalizada por la enzima dando lugar a una señal detectable. El nombre de esta técnica viene dado por la localización del antígeno entre dos anticuerpos, el de captura y el primario, formando un sándwich (Figura A.17). La sensibilidad de este método ELISA es de 2 a 5 veces superior a la de los otros métodos comentados anteriormente. Además, la especificidad es muy elevada ya que se emplean dos anticuerpos para detectar el antígeno. Sin embargo, se puede encontrar una desventaja en la selección de los dos anticuerpos, ya que es importante reducir la reactividad cruzada entre los mismos. Actualmente esta desventaja se encuentra solventada gracias al desarrollo comercial de pares de anticuerpos compatibles y previamente optimizados. Los ELISA tipo sándwich son especialmente adecuados para el análisis de muestras complejas, ya que no es necesario purificar el antígeno antes del ensayo y, a pesar de ello, proporcionan una gran sensibilidad y especificidad (por ejemplo, midiendo los niveles de citoquinas en una respuesta inmune). En la presente Tesis, se muestran resultados de ensayos ELISA realizados mediante el método sándwich.

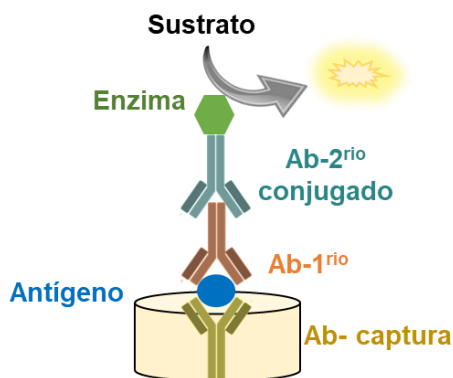


Figura A.17. Esquema de detección mediante ELISA sándwich.

La técnica *ELISA competitiva* fue desarrollada en 1976,<sup>380</sup> y el factor clave en este tipo de ensayos es la reacción competitiva entre el antígeno de la muestra y el antígeno que se soporta sobre la placa con el anticuerpo primario (Figura A.18). En primer lugar, el anticuerpo primario se incuba con el antígeno de la muestra, y los complejos antígeno-anticuerpo resultantes se añaden a pocillos que han sido recubiertos con el mismo antígeno. Tras un periodo de incubación se elimina cualquier anticuerpo no unido al antígeno. Cuantos más antígenos haya en la muestra, más anticuerpos primarios se ligarán al antígeno de la muestra. Por lo tanto, habrá una cantidad más pequeña de anticuerpos primarios disponibles para unirse al antígeno que se encuentra soportado en los pocillos de la placa, resultando en una reducción de la señal. Existe, por lo tanto, una proporción inversa entre la concentración del analito y la intensidad de la coloración resultante.

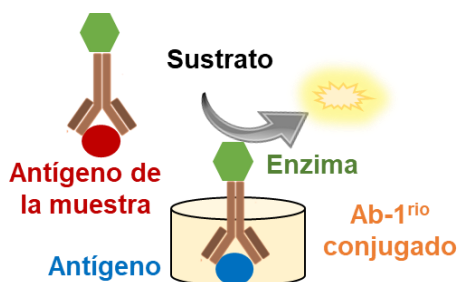


Figura A.18. Esquema de detección mediante ELISA competitivo.

#### A.2.7. Estudios de proteómica cuantitativa

La proteómica puede describirse como el análisis de proteínas a gran escala o, de una manera más exhaustiva, como la identificación y cuantificación de proteínas junto con la determinación de sus localizaciones, modificaciones, interacciones, actividades y funciones.<sup>381</sup> Originalmente, la palabra proteómica se asociaba al gran número de proteínas procedentes de

una línea celular o un organismo que podían observarse en un gel de poliacrilamida. En este sentido, la proteómica se remonta ya a finales de los años setenta, cuando los investigadores empezaron a construir bases de datos de proteínas utilizando la técnica de electroforesis en gel. Sin embargo, la falta de métodos analíticos rápidos y sensibles para la caracterización de proteínas, hacía tedioso el proceso de análisis e identificación de las mismas. En la década de 1990, la espectrometría de masas aplicada al estudio de muestras biológicas surgió como una poderosa técnica analítica que eliminó la mayoría de las limitaciones del análisis de proteínas. Este desarrollo, junto con la disponibilidad de toda la secuencia de codificación humana en bases de datos públicas, y el descubrimiento y desarrollo de métodos de ionización blandos, marcó el comienzo de una nueva era.

- Principios e instrumentación de espectrometría de masas para su aplicación en estudios de biomoléculas.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que se emplea para determinar la masa molecular de un compuesto mediante el uso de instrumentos que pueden medir la relación masa/carga ( $m/z$ ) de iones trabajando en condiciones de vacío. Estos instrumentos se denominan espectrómetros de masas, y consisten en una fuente de iones, un analizador de masas que permite separar los analitos ionizados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ), y un detector que registra el número de iones de cada valor  $m/z$  (Figura A.19).

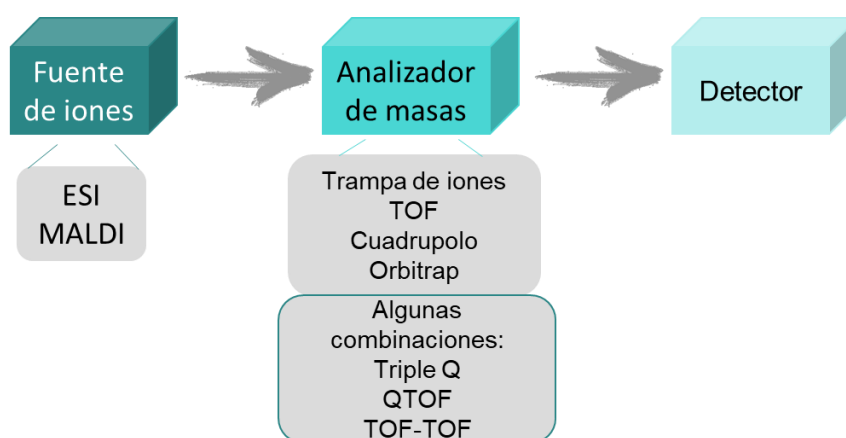


Figura A.19. Esquema de los principales componentes de un espectrómetro de masas para su aplicación en proteómica.

Las **fuentes de iones** más empleadas para la ionización de proteínas o péptidos en análisis por espectrometría de masas son la **ionización por electrospray (ESI)**<sup>382</sup> y la **ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI)**<sup>383</sup>, ya que se caracterizan por ser



dos métodos de ionización suave. En ESI se produce la ionización de los analitos de una disolución y por ello se puede acoplar fácilmente a cromatografía de líquidos. En MALDI las muestras son sublimadas e ionizadas a partir de una matriz seca y cristalina mediante pulsos láser. La espectrometría de masas con ionización MALDI se utiliza normalmente para analizar mezclas de péptidos relativamente simples, mientras que para el análisis de muestras complejas son preferibles los sistemas ESI-MS acoplados a cromatografía de líquidos.

El proceso de ionización mediante **MALDI** se basa en el bombardeo, con un pulso láser, de los analitos previamente embebidos en una matriz sólida permitiendo su posterior ionización. Así esos iones, en fase gaseosa, se aceleran hacia el analizador por el campo eléctrico aplicado (Figura A.20 A). Habitualmente se emplean moléculas orgánicas pequeñas que puedan absorber la luz UV para la formación de la matriz, como es el caso del ácido sinapínico (SA), el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHBA) o el ácido succínico. Los iones de los analitos obtenidos son predominantemente el ion molecular  $[M^+]$  o los iones  $[M+H^+]$ . Los iones multicargados no se obtienen mediante esta técnica de ionización salvo en el caso de moléculas grandes.

Por otro lado, la ionización mediante electrospray (**ESI**) se basa en la dispersión de un líquido por acción de un campo eléctrico. La disolución de muestra que contiene iones de analito, se bombea a una cámara a través de un capilar o aguja. Allí se aplica una diferencia de potencial de varios kilovoltios entre el capilar y la pared opuesta de la cámara, creando un campo eléctrico intenso en la salida capilar. Si el capilar tiene un potencial positivo (ionización en modo positivo), se retienen los iones negativos y los iones positivos se alejan del capilar hacia la pared de la cámara opuesta originando un cono líquido en el extremo del capilar. En la punta de este cono se forman gotas con iones de analito cargados positivamente. Éstos, son arrastrados a través de la cámara por el campo eléctrico mientras que van perdiendo solvente debido a la evaporación del mismo. Finalmente, se produce la desintegración de dichas gotas dando lugar a los iones del analito cargados. Este proceso tiene lugar por la desestabilización de las fuerzas repulsivas en la superficie de la gota y la tensión superficial. La ruptura de las gotas se produce sucesivamente hasta que el analito está desolvatado y se transfiere al analizador de masas (Figura A.20 B). Los iones formados mediante ESI pueden presentar cargas múltiples, dando lugar en el caso de péptidos a señales de  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$  y  $[M+3H]^{3+}$ , principalmente. En el caso de trabajar con ionización en modo negativo, los iones negativos serán los que vayan hacia el extremo del capilar y por consiguiente los que lleguen al analizador de masas. En este caso se trabaja con valores de pH elevados a diferencia de la ionización en modo positivo. Es importante destacar que este método de ionización requiere niveles bajos de impurezas, así como concentraciones bajas de sales o tampones para una buena formación del electrospray. Generalmente, se emplean disolventes orgánicos y ácidos orgánicos volátiles

como el ácido fórmico para promover la formación de los cationes, así como para eliminar las impurezas previamente a la ionización.

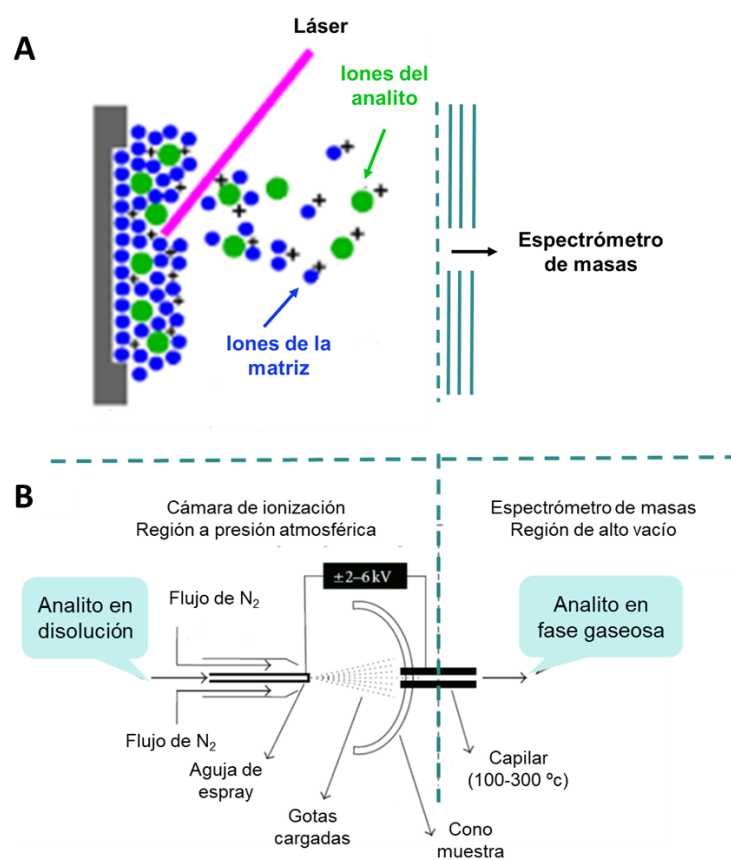


Figura A.20. Representación de las principales fuentes de iones. Esquema de la desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI) (A). Esquema de la fuente de ionización ESI. Adaptada de referencia<sup>384</sup> (B).

En el contexto de la proteómica, los parámetros clave son la sensibilidad, la resolución, la exactitud de masa y la capacidad de generar espectros de masas de iones ricos en información a partir de fragmentos de péptidos (masas en tándem o espectros MS/MS).<sup>385,386</sup> Para conseguir estos requisitos existen distintos analizadores de masas que se utilizan habitualmente en este tipo de estudios: analizador de tiempo de vuelo (TOF), cuadrupolo (Q), trampa de iones y orbitrap. Todos ellos se diferencian en el diseño y rendimiento, y aunque inicialmente se empleaban de forma independiente, los progresos para mejorar las prestaciones del espectrómetro de masas han llevado al desarrollo de analizadores basados en combinaciones de los mismos, como es el caso del triple cuadrupolo (QqQ), el Q-TOF, el TOF-TOF y la combinación de la trampa de iones con el Orbitrap, entre otros.<sup>387</sup>

El **analizador de tiempo de vuelo (TOF)** permite obtener elevada resolución y precisión en la determinación de la masa incluso en moléculas de elevados pesos moleculares. Los iones desorbidos por el pulso del láser se aceleran en un campo eléctrico a una energía cinética de varios keV. A continuación, entran en un tubo libre de campo en el que se desplazan con diferentes velocidades en función de sus relaciones masa/carga. Al final del tubo, los iones chocan con un detector y el tiempo de deriva se mide electrónicamente (Figura A.21 A). La relación  $m/z$  del ion es proporcional al cuadrado del tiempo de deriva. Por lo que la masa de un ion específico se puede determinar midiendo el tiempo de deriva cuando el analizador ha sido calibrado con sustancias de una carga y masa conocidas.

Un analizador de masas de tipo **cuadrupolo (Q)** consta de cuatro electrodos paralelos que actúan como un filtro de masas (Figura A.21 B). Es decir, en función del campo aplicado sobre los electrodos los iones de ciertos valores  $m/z$  (iones resonantes) podrán atravesar el analizador gracias a presentar una trayectoria estable. Aquellos iones que difieren de esos valores de relaciones  $m/z$ , denominados iones no resonantes, terminan colisionando y por lo tanto no llegan al detector.

La **trampa de iones** puede encontrarse en configuración 3D, denominada **QIT**, o en 2D denominada trampa lineal de iones o **LTQ**. La QIT consta de tres electrodos, uno de ellos en forma de anillo y los otros dos que actúan como tapa de entrada y salida, respectivamente (Figura A.21 C). Los iones entran en la trampa donde se aplican diferentes voltajes empleando campos eléctricos o magnéticos de modo que los iones quedan atrapados y concentrados según su trayectoria de oscilación estable. La naturaleza de la trayectoria depende del potencial y de la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los iones. Durante la detección, los potenciales de los electrodos se alteran para provocar inestabilidad en las trayectorias de los iones y expulsarlos en la dirección axial en función de su relación  $m/z$  dando lugar a un espectro de masas (MS). Por otro lado, la LTQ consiste en cuatro barras paralelas que presentan tres secciones con ranuras en las barras de salida para la extracción de iones. El funcionamiento interno es esencialmente el mismo que en la trampa tradicional, con la particular diferencia, de que los iones son confinados únicamente en 2 dimensiones y la extracción de los mismos se produce radialmente a través de las ranuras existentes en las barras (Figura A.21 C). Esta configuración mejora la eficacia de confinamiento y con ello la sensibilidad. Además, este tipo de analizadores permiten que una vez se han confinado los iones, éstos puedan ser fragmentados en la propia trampa dando lugar a los iones producto.

La idea del analizador de masas **orbitrap** está compuesto por un electrodo interno cubierto por dos electrodos cóncavos exteriores, separados por un anillo fino de material dieléctrico, sobre los que se origina un campo eléctrico lineal (Figura A.21 D). Cuando los iones se introducen tangencialmente en la órbita entre los electrodos internos y externos a un

determinado potencial se consigue una trayectoria espiral alrededor del electrodo interno. Sin embargo, debido a la forma cónica de los electrodos, se induce una oscilación axial armónica en los iones de tal forma que los electrodos externos pueden detectar ese movimiento armónico axial. Esta imagen de señal es digitalizada y transformada mediante la transformada de Fourier del dominio de tiempo al dominio de frecuencia, de tal forma que las frecuencias armónicas axiales son proporcionales a los  $m/z$  de los iones.

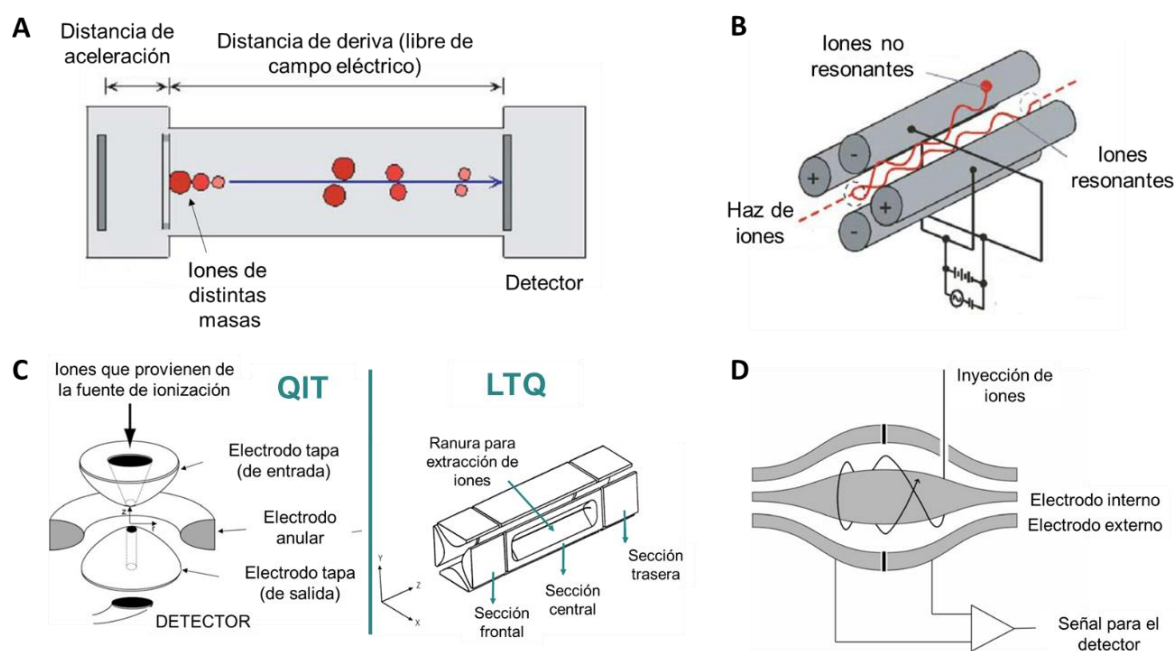


Figura A.21. Representaciones de los principales analizadores de masas: analizador de tiempo de vuelo (TOF), adaptada de referencia<sup>359</sup> (A), analizador cuadrupolo, adaptada de referencia<sup>359</sup> (B), trampa de iones (QIT y LTQ), adaptada de referencia<sup>388</sup> (C) y orbitrap, adaptada de referencia<sup>387</sup> (D).

En el análisis de proteínas y péptidos es importante destacar la necesidad de un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) que permita la fragmentación de los péptidos para obtener una información más detallada de la molécula objeto de estudio. Para ello, la instrumentación empleada se basa esencialmente en combinaciones de los analizadores de tal forma que se pueda emplear un analizador como seleccionador de iones de un valor  $m/z$  particular, para posteriormente llevar a cabo su fragmentación y, posteriormente el análisis de los iones del producto resultante utilizando otro analizador de masa.

Una de las combinaciones más empleadas actualmente son las que acoplan cuadrupolos con analizadores de tiempo de vuelo (**Q-TOF**) (Figura A.22 A) o el acoplamiento de dos de estos últimos (**TOF-TOF**) (Figura A.22 B). En primer lugar se seleccionan los iones precursores que son fragmentados, en un cuadrupolo en el caso del Q-TOF o en la región entre analizadores en el caso del TOF-TOF, y finalmente los iones fragmento son escaneados en el último analizador.

El analizador híbrido **TOF-TOF** ofrece una conmutación electrónica de los diferentes pasos muy rápida de tal manera que puede emplearse fácilmente en el análisis de péptidos obtenidos por digestión de proteínas. Por otro lado, el analizador híbrido **Q-TOF** ofrece varias ventajas como son la mayor precisión de masa, mayor resolución y mayor velocidad de escaneado en comparación con los analizadores de masa de triple cuadrupolo, lo que hacen de este tipo de analizadores uno de los más empleados en estudios proteómicos.

También hay que destacar la combinación de una trampa lineal con orbitrap (**LTQ-Orbitrap**), la cual permite obtener una máxima resolución y precisión de masa, así como velocidad y sensibilidad (Figura A.22 C). Este análisis de alta resolución y precisión, permite determinar el estado de carga y la masa de mezclas de especies con carga múltiple, satisfaciendo así una de las necesidades del campo de la proteómica.

Otra combinación empleada para determinadas aplicaciones, es la del triple cuadrupolo (**QqQ**), en donde en el primer cuadrupolo (Q1) actúa en la selección de los iones precursores, el segundo cuadrupolo (Q2) actúa como celda de colisión y finalmente el tercer cuadrupolo (Q3) escanea las masas de los iones producto para la obtención del espectro final (Figura A.22 D). Este tipo de combinación permite la variación de diferentes modos de selección entre escaneos de un rango o un valor fijo de  $m/z$ , ofreciendo diferentes posibilidades de análisis.<sup>387</sup>

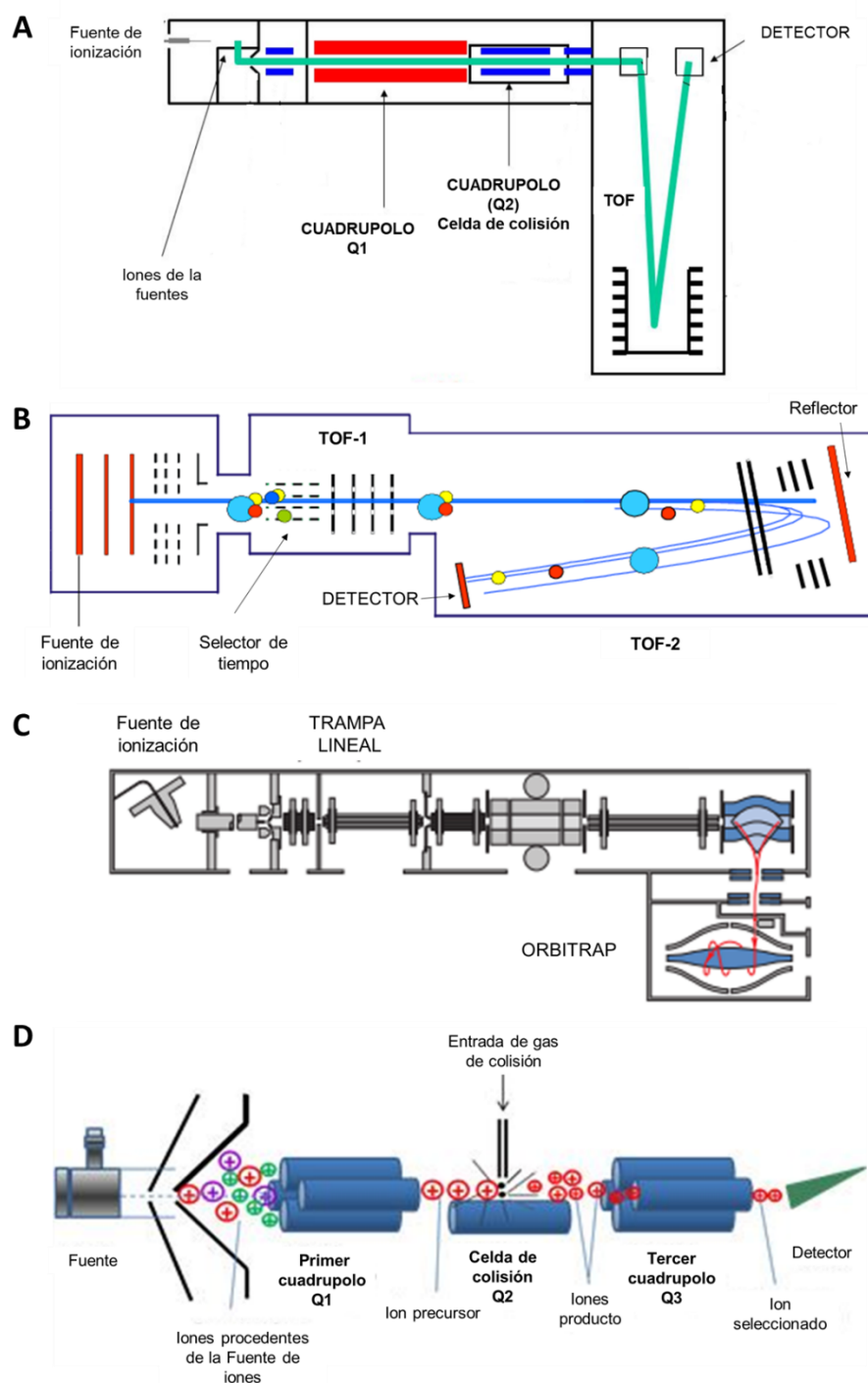


Figura A.22. Representación de analizadores híbridos: cuadrupolo-tiempo de vuelo (*Q-TOF*) (A), o dos analizadores de tiempo de vuelo (*TOF-TOF*) (B), trampa de iones-orbitrap (*LTQ-orbitrap*). Adaptada de referencia.<sup>389</sup> (C) y triple cuadrupolo (*QqQ*) (D).

A modo general en todos los analizadores que se han comentado anteriormente una de las etapas más relevantes es la fragmentación de los iones precursores, la cual permite la generación de espectros MS/MS. Este proceso de ruptura puede llevarse a cabo mediante: una disociación inducida por colisión (CID), una activación inducida por un fotón, una disociación

por transferencia de electrones (ETD) o una activación mediada por electrones (EDC), entre otras.<sup>384,387</sup> La disociación más común es la inducida por colisión (CID) en la cual el ion precursor gaseoso colisiona con un gas inerte que se encuentra en el interior de la celda. Este gas generalmente es nitrógeno, helio o argón. Como resultado de la colisión, el ion precursor se encontrará en un estado excitado e inestable, lo que origina su descomposición en iones producto. En el caso de la fragmentación de péptidos, cuando estos se ionizan en modo positivo, los protones se localizan en los sitios básicos (Arg, Lys o en el N-terminal). Cuando ocurre la colisión, los protones ionizados se mueven hacia los enlaces amida del esqueleto del péptido siguiendo el modelo denominado “modelo del protón móvil”.<sup>390</sup> De acuerdo con este modelo los péptidos se fragmentan dando lugar a diferentes iones:<sup>384,388</sup> los iones fragmento que contienen el N-terminal, los cuales se denominan  $a_n$ ,  $b_n$  y  $c_n$ , y los iones fragmento que contienen el C-terminal, que se denominan  $x_n$ ,  $y_n$  y  $z_n$ , tal y como muestra en la Figura A.23.

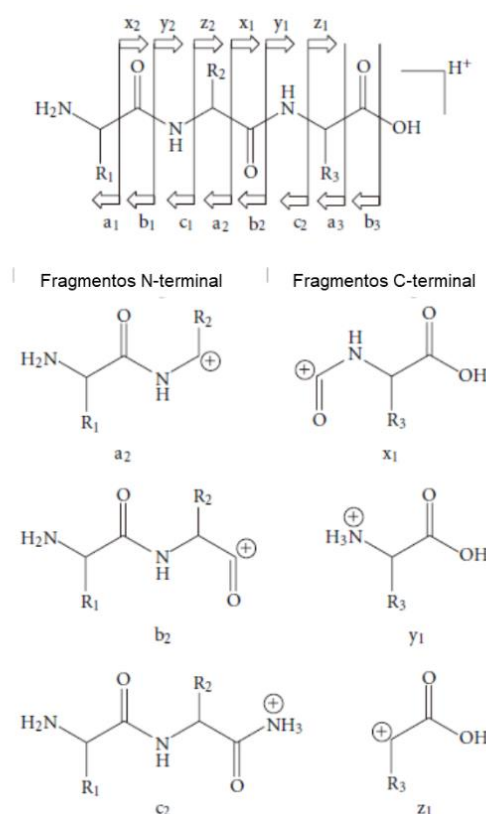


Figura A.23. Nomenclatura de los fragmentos de péptidos. Adaptada de la referencia<sup>384</sup>

- Métodos de cuantificación en estudios proteómicos basados en espectrometría de masas.

Al hablar de cuantificación en espectrometría de masas aplicada a biomoléculas podemos diferenciar dos tipos: **cuantificación absoluta**, en donde se determina la cantidad de la biomolécula de interés; o **cuantificación relativa**, donde la cantidad de una sustancia se define

en relación a otra medida de la misma sustancia en otras condiciones, es decir, como un cambio de abundancia de dicha sustancia.

Tradicionalmente, la espectrometría de masas ha sido ampliamente utilizada para análisis cuantitativos de moléculas pequeñas específicas, con excelente precisión y alta especificidad y rendimiento. Sin embargo, el proceso de ionización suele ser poco reproducible, lo que se suma a la variabilidad de los procedimientos de preparación de muestras. Con el fin de superar estas desventajas, se requiere una normalización para reducir los errores. Principalmente, estos errores pueden reducirse significativamente utilizando patrones internos. Con respecto a éstos, es importante que estén bien caracterizados tanto física como químicamente, y que sean apropiados para el analito que se está analizando. Por esta razón, una de las estrategias más empleadas se basa en la teoría de la dilución de isótopos estables en la cual se define que una molécula marcada isotópicamente será químicamente idéntica a su homólogo nativo y por ello, el comportamiento cromatográfico y en el espectrómetro de masas también será idéntico. El marcaje isotópico fue introducido en proteómica en 1999 por diferentes laboratorios<sup>391-393</sup> y es ampliamente adoptado en diferentes campos<sup>394</sup>. Según esto, se podría hablar de una clasificación alternativa de los métodos cuantitativos en proteómica en función de si se basan en marcaje o si son libres de marcaje isotópico.

Teniendo en cuenta lo comentado anteriormente se podrían resumir todas las estrategias cuantitativas<sup>395,396</sup> en la Figura A.24.



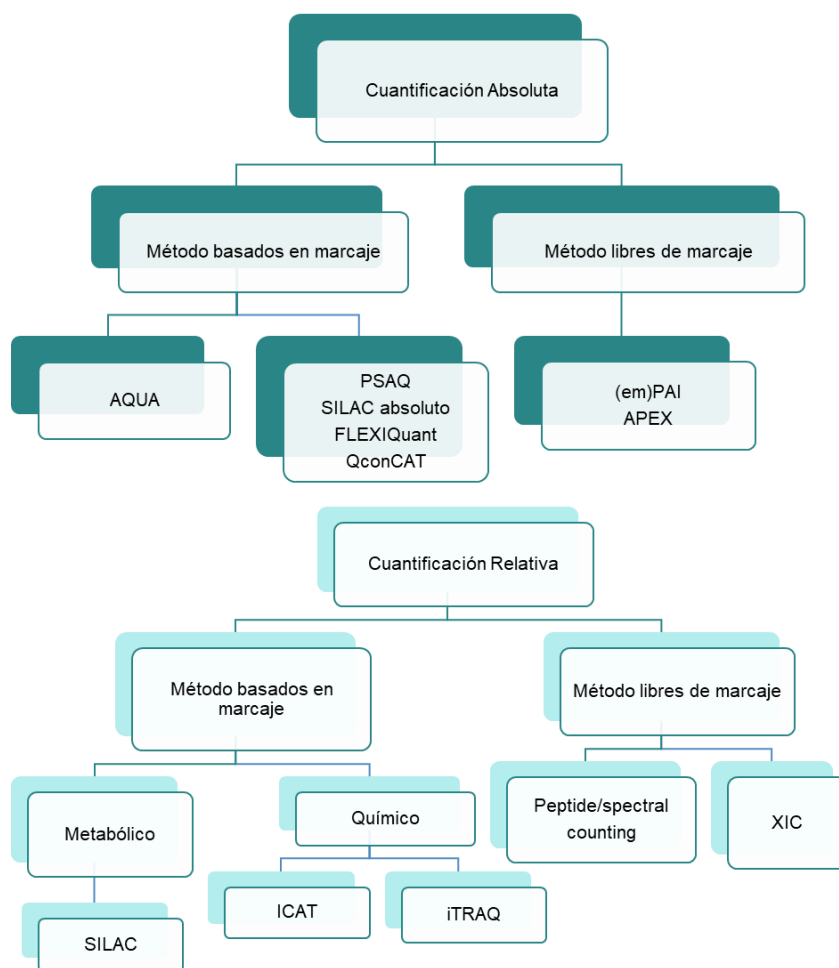


Figura A.24. Clasificación de los principales métodos de cuantificación absoluta y relativa en proteómica cuantitativa.

El auge de los distintos métodos de cuantificación en el campo de la proteómica ha dado lugar a un amplio espectro de aplicaciones de los mismos, tales como: estudios de modificaciones de proteínas (fosforilaciones y acetilaciones importantes en epigenética y señalización celular), descubrimiento de nuevos biomarcadores, identificación y cuantificación de proteínas en fluidos biológicos, descubrimiento de nuevos fármacos, así como proteínas diana farmacológicamente activas.<sup>397</sup>

La **cuantificación absoluta** ofrece una información muy importante, sin embargo, los métodos basados en marcaje son relativamente laboriosos y los libres de marcaje son menos precisos. Generalmente este tipo de cuantificación se lleva a cabo a nivel de péptidos. El método más empleado en este tipo de cuantificación se denomina **AQUA**,<sup>398</sup> e implica el uso de patrones internos que son péptidos marcados con isótopos pesados estables (péptidos AQUA). Generalmente, los péptidos marcados se sintetizan a partir de la secuencia del péptido seleccionado de la proteína de interés. Los péptidos sintéticos son añadidos en una cantidad

conocida a la muestra, de tal forma que, tras el análisis, la intensidad de los iones fragmento de los péptidos de interés es comparada con esos mismos fragmentos pero de los péptidos AQUA. Como la cantidad de los péptidos sintéticos es conocida, se puede determinar la cantidad de ese péptido en la muestra real. Los péptidos que se van a emplear para generar un péptido sintético, que pueda ser empleado como patrón interno, deben presentar buena eficacia de ionización, buena separación cromatográfica, sufrir las mínimas modificaciones en el proceso de análisis y ser únicos de la proteína de interés. Los péptidos que cumplen estos requisitos son denominados péptidos proteotípicos<sup>399</sup> y pueden identificarse o predecirse mediante las bases de datos y librerías de péptidos.

Este método se puede emplear para monitorizar cambios en modificaciones postraduccionales<sup>400</sup> y para determinar la estequiometría de las subunidades de un complejo de proteínas.<sup>401</sup> La ventaja que ofrece este método es que se obtiene elevada precisión en los resultados de cuantificación absoluta. Sin embargo, los costes son elevados, se requiere información previa de los péptidos cuantificados, y solo se pueden cuantificar unos cuantos péptidos por proteína.<sup>396</sup> En base a estas desventajas se han desarrollado otros métodos donde se emplean patrones de proteínas marcadas isotópicamente como los denominados, **PSAQ** (*protein standard absolute quantification*), **SILAC absoluto**, **FLEXIQuant** (*Full-length expressed stable isotope-labeled proteins for absolute quantification*) o **QconCAT** (*concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes*). En todos los casos los patrones de proteínas marcadas se añaden a la muestra de forma previa a la digestión de la misma.<sup>396,397,402</sup>

Los métodos libres de marcajes para la cuantificación absoluta no requieren de introducción de patrones internos y permiten comparar un mayor número de muestras que los métodos basados en marcaje. Sin embargo, estos métodos presentan baja precisión y requieren de elevada reproducibilidad. Uno de los métodos más conocido es el basado en el índice de abundancia de una proteína, PAI.<sup>403</sup> Este parámetro se calcula dividiendo el número de péptidos observados entre el número de péptidos observables teóricos. Más tarde, se denominó el parámetro **emPAI**<sup>404</sup> ( $\text{emPAI} = 10^{\text{PAI}} - 1$ ), el cual era el PAI modificado exponencialmente y que era proporcional al contenido de una proteína en una mezcla. Otro de los métodos libres de marcaje se basa en el recuento espectral y es denominado **APEX**.<sup>405</sup> Una de las características más importantes del APEX es el factor de corrección que introduce, proporcionando una relación de proporcionalidad directa entre el número de péptidos observados y esperados.

En la **cuantificación relativa** se busca la obtención de una relación de abundancias de los péptidos o proteínas de interés por comparación entre las señales originadas en distintas muestras. Para conseguir esto, la mayoría de los métodos que encontramos se basan, igual que

los comentados anteriormente, en marcaje con isótopos estables. Pero en este caso el marcaje se puede llevar a cabo de forma metabólica o química.

El **marcaje metabólico** introduce los isótopos marcados en el primer paso del experimento, concretamente, durante el crecimiento y duplicación de las células (Figura A.25). Esto implica el crecimiento de las células o los organismos en medios que contienen ciertos componentes en su forma isotópica pesada. Aunque inicialmente se describieron algunos marcajes de este tipo con medios de cultivos enriquecidos en  $^{15}\text{N}$ , el auge de este marcaje vino con la estrategia **SILAC** (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*), descrito por Mann y sus colaboradores en 2002.<sup>406</sup> En esta estrategia, los aminoácidos marcados y sin marcar, son empleados por las células para sintetizar sus proteínas. Habitualmente este tipo de experimentos emplea  $^{13}\text{C}_6$ -lisina (Lys) y  $^{13}\text{C}_6$ -arginina (Arg), lo que asegura que tras la digestión con tripsina los péptidos resultantes tengan al menos un aminoácido marcado (excepto el péptido que contienen el C-terminal de la proteína). Estos péptidos marcados presentarán un incremento de masa con respecto a su homólogo sin marcar. La identificación de la proteína se lleva a cabo con los espectros de fragmentación de al menos uno de los péptidos que coeluyen (marcado y sin marcar), mientras que la cuantificación se lleva a cabo comparando las intensidades del perfil isotópico de los péptidos marcados y sin marcar.

En comparación con el marcaje de proteínas con  $^{15}\text{N}$ , el número de marcajes incorporados en el experimento SILAC es definido y no depende de la secuencia de los péptidos, por lo que se facilita el análisis de los datos. Los marcajes metabólicos ofrecen una gran ventaja, ya que las muestras a comparar se mezclan al principio del proceso analítico, evitando así los errores ocasionados en la variabilidad de los tratamientos de muestra (Figura A.25).

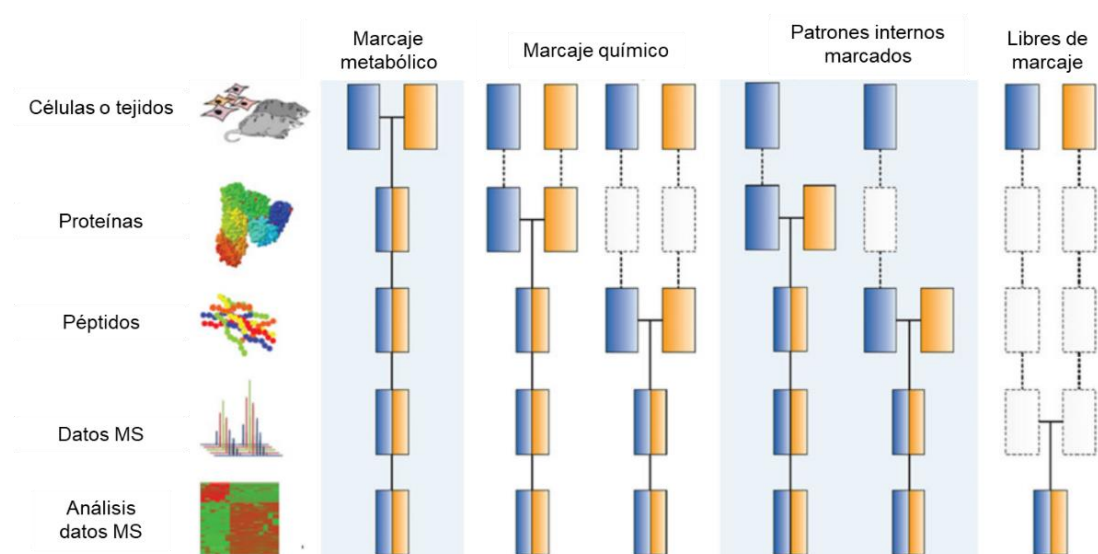


Figura A.25. Esquemas de trabajo en las diferentes metodologías de proteómica cuantitativa. Los cuadros naranjas y azules representan distintas condiciones experimentales. Las líneas discontinuas indican el tratamiento de muestra independiente y las líneas continuas la mezcla de las dos muestras. Adaptada de referencia.<sup>397</sup>

Sin embargo, aunque la metodología SILAC ofrece numerosas ventajas, es importante destacar que para llevar a cabo una buena interpretación de los resultados obtenidos tiene que existir una incorporación completa de los aminoácidos pesados. En líneas celulares inmortalizadas, se puede obtener el marcaje de las proteínas al prácticamente 100% tras 6-8 doblajes en medios suplementados con aminoácidos pesados.<sup>406</sup> Además, se debe tener en cuenta que se puede producir una conversión de los aminoácidos marcados en las células, dando lugar a una cuantificación incorrecta cuando, por ejemplo, se activa la conversión de arginina a prolina si existe un exceso de arginina en el medio.<sup>407,408</sup>

Los últimos avances en marcajes metabólicos se basan en cuantificación de proteínas en animales y tejidos humanos. Para ello se ha definido una nueva metodología basada en SILAC, denominada **super SILAC**, en donde se usan líneas celulares como patrones internos para la cuantificación de proteínas en tejidos. Este método se divide en un proceso en dos etapas: primero las proteínas de cada tejido (sin marcar) se cuantifican respecto a las células (marcadas); posteriormente, las diferencias entre las muestras de tejido se calculan en función de una relación de los dos cocientes o relaciones SILAC obtenidas en la primera etapa. En la Figura A.26 se puede ver de forma resumida la comparación entre la metodología SILAC y super SILAC.

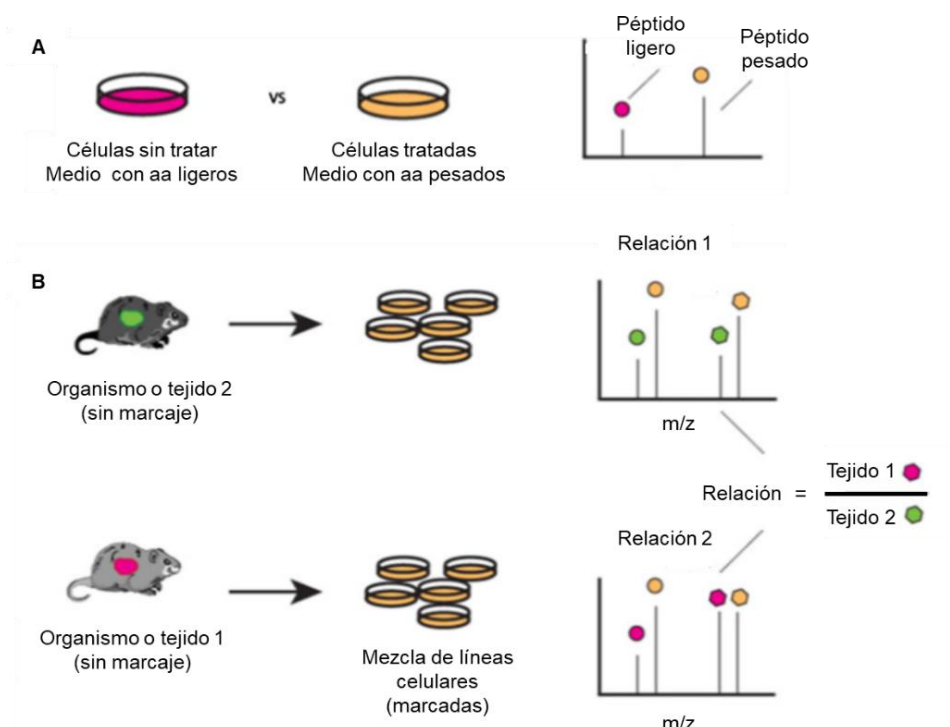


Figura A.26. Esquema de la metodología SILAC tradicional (A) y super SILAC (B).

El **marcaje químico** se basa principalmente en el uso de isotopos estables pesados para marcar las proteínas o péptidos tras su síntesis mediante una derivatización *in vitro*. Uno de los primeros marcajes químicos es el denominado **ICAT** (*isotope-coded affinity tags*).<sup>393</sup> El marcaje ICAT se basa en la derivatización de los residuos cisteína del analito con un reactivo que contiene: un grupo reactivo de tipo tiol, el cual se enlaza a las cisteínas, un grupo de afinidad para el aislamiento de los péptidos marcados, generalmente biotina, y un grupo de unión que puede presentarse en forma ligera (con distribución isotópica natural) o pesada (que contiene ocho átomos de deuterio en lugar de  $^1\text{H}$ ), tal y como se representa en la Figura A.27.

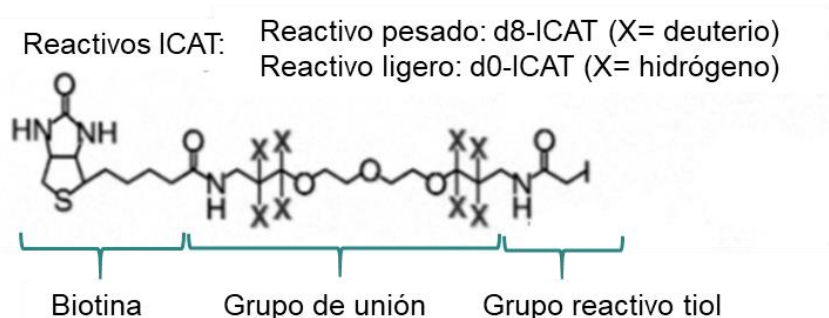


Figura A.27. Reactivo ICAT. Adaptada de referencia.<sup>393</sup>

Las dos muestras proteicas son marcadas con el reactivo ICAT ligero o pesado y posteriormente mezcladas. Los péptidos marcados, tras la digestión con tripsina, pueden separarse mediante una columna de afinidad y analizarse mediante espectrometría de masas. La intensidad relativa de los péptidos idénticos de cada muestra (se diferencian en una masa de 8 Dalton) muestran la abundancia de la proteína de la que proceden. De tal forma que, comparando las intensidades de ambos, ligero y pesado, se puede calcular la relación.

Alguna de las desventajas que muestra este método es la reactividad lateral del reactivo ICAT, así como la incapacidad para marcar péptidos que no contengan cisteína, limitando así el estudio.

Un grupo importante de reactivos empleados para cuantificación relativa comprenden los denominados marcajes químicos isobáricos. Uno de los más conocidos son los reactivos de marcaje **iTRAQ**<sup>409,410</sup> (Isobaric tags for relative and absolute quantification) que contienen: un grupo reactivo, que es el empleado en la unión con los péptidos a través de los grupos amino terminal o de las lisinas, un grupo de balance o compensador y un ion reportero (Figura A.28A).

Las diferentes muestras se marcan con reactivos que contienen diferentes distribuciones de isótopos pesados entre los grupos balance y reportero (Figura A.28B) y posteriormente se mezclan. Los péptidos idénticos de las muestras que se van a comparar coeluyen y se detectan como un solo ion precursor. Los reactivos iTRAQ están diseñadas de tal manera que tras la fragmentación, diferentes reactivos dan lugar a iones reporteros con idéntica composición química pero diferentes pesos moleculares, debido a sus distintas composiciones isotópicas. Sus intensidades son proporcionales a la abundancia relativa del péptido marcado procedente de las diferentes muestras. Una ventaja importante de este método es que es capaz de comparar y cuantificar hasta ocho muestras que pueden ser analizadas dentro de un solo experimento.

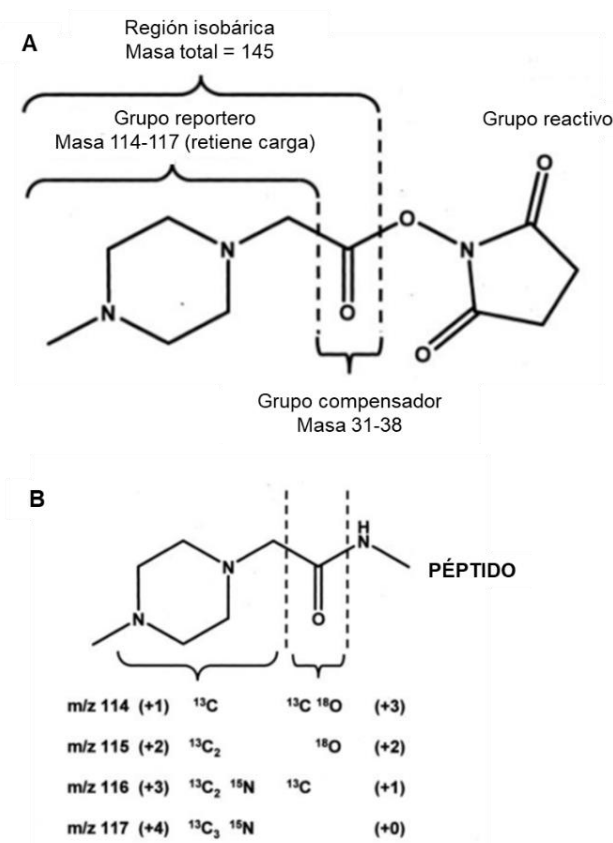


Figura A.28. Reactivo iTRAQ (A) y las posibles configuraciones de isótopos que mantienen el balance de masa entre los componentes del reactivo (B).

A modo general los métodos comentados anteriormente basados en marcaje isotópico, tanto metabólico como químico, suponen elevados costes y requieren de etapas adicionales en la preparación de la muestra para realizar dicho marcaje. Por ello, los métodos libres de marcaje no dejan de emplearse como alternativa. Estos métodos pueden dividirse en los que se basan en comparación de intensidad de la señal de los péptidos y los que se basan en el recuento del número de péptidos identificados o espectros de fragmentos adquiridos.

En el primero de los métodos se emplea el cromatograma de las medidas de LC-MS para extraer las áreas de los picos de ciertos iones, esto es lo que se conoce como **XIC** (*extracted ion chromatogram*).<sup>411-413</sup> Estas áreas pueden emplearse para la cuantificación relativa entre diversas muestras. Sin embargo, se deben tener en cuenta diversos factores que pueden originar una variabilidad entre los resultados obtenidos. En primer lugar, la variación en las intensidades de los picos de una misma muestra entre diferentes medidas. En segundo lugar, la variación de los tiempos de retención o de los valores m/z para péptidos idénticos entre distintas medidas. Por ello se requieren procesos de normalización y alineamientos de los

espectros para eliminar las derivas en los tiempos de retención. Además, hay que asegurar la reproducibilidad de la separación y la estabilidad de la fuente de ionización.

El otro método de cuantificación relativa libre de marcaje, implica que los péptidos más abundantes son detectados con mayor facilidad mediante espectrometría de masas. Por ello, se emplea el número de péptidos o número de espectros de los fragmentos observados para la cuantificación.<sup>414,415</sup> Aunque Liu et al. encontraron una relación lineal de dos órdenes de magnitud entre el número de espectros y la abundancia relativa de la proteína, no existe correlación entre la cantidad relativa de la proteína y el número de péptidos observados.<sup>416</sup>

La variedad de métodos descritos anteriormente para estudios de proteómica cuantitativa dan idea del auge de este campo. Actualmente estos métodos están siendo empleados tanto en investigación básica como aplicada. Su avance en estudios de organización celular abarca desde identificación de parejas de proteínas que interaccionan o determinación de la topología de subunidades en complejos proteicos hasta el estudio de resolución espacial del proteoma combinando estas técnicas con actividades enzimáticas para marcar proteínas próximas o que interaccionan con las proteínas de interés. Además, en el campo aplicado se pueden encontrar estudios en medicina molecular. Uno de los retos en estudios clínicos es la necesidad de un gran número de pacientes para realizar análisis que reduzcan la variabilidad biológica; por ello este tipo de técnicas de análisis proteómico permite la cuantificación de cantidades elevadas de proteínas de diversos pacientes, consiguiendo buena repetibilidad, sensibilidad y robustez.

En la presente Tesis Doctoral se mostrarán estudios proteómicos basados en la estrategia SILAC para el estudio de mecanismos de toxicidad de nanopartículas así como para el descubrimiento de nuevas dianas en biomedicina. La selección de este tipo de marcaje metabólico permite minimizar los errores del tratamiento de muestras, y a su vez facilita el análisis, en un solo experimento del contenido proteico de lisados totales de determinadas líneas celulares. Es importante destacar que esta metodología también permite la combinación con diferentes métodos de fraccionamiento y aislamiento de determinados grupos de proteínas, con el fin de mejorar la cuantificación de proteínas que se encuentren en menor abundancia en la célula.





**ANEXO B: APORTACIONES  
CIENTIFICAS DERIVADAS DE LA  
PRESENTE TESIS DOCTORAL**

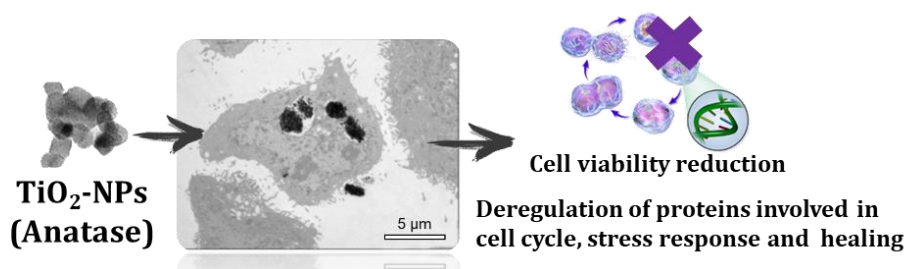


## Comunicaciones a congresos:

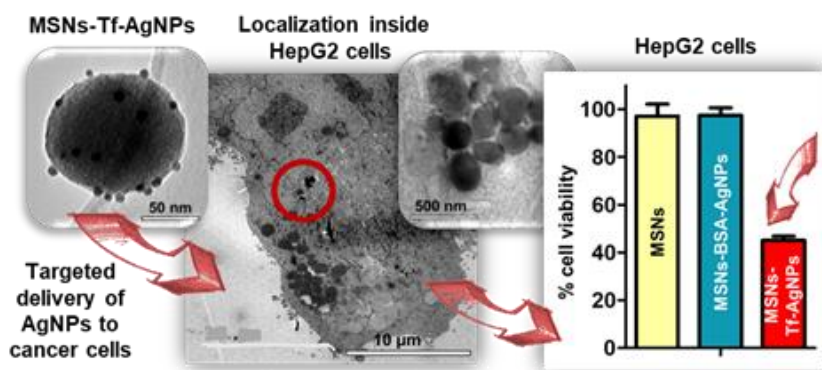
- XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (2013) “Bioanalytical tools for evaluating the potential toxicity induced by TiO<sub>2</sub> nanoparticles in epithelial cells” **S. Montalvo-Quirós**, F.J. García-Campos, A. Castano, C. Cámara, J.L. Luque-García. Comunicación tipo póster.
- ORQUE SUDOE Summer School training curse (2014) “A quantitative proteomic approach for uncovering the molecular mechanisms associated to TiO<sub>2</sub> nanoparticles toxicity” **S. Montalvo-Quirós**, C. Cámara, J.L. Luque-García. Comunicación oral.
- VII Workshop de Nanociencia y Nanotecnología Analítica (2015) “Supported Silver Nanoparticles on Transferrin Decorated Mesoporous Silica Nanoparticles: Hybrid Nanosystems for Cancer Cell Targeting” **S. Montalvo-Quirós**, C. Cámara, M. Vallet-Regí, J.L. Luque-García, B. González. Comunicación tipo poster.
- XX Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (2015) “*Bioanalytical strategies for assessing nanoparticles toxicity.*” **J.L. Luque-García**, J. Espadas-Moreno, H. Estevez, M.N. Fernández-Muñiz, E. García-Calvo, J.C. García-Lidón, **S. Montalvo-Quirós**, C. Cámara. Comunicación tipo oral.
- Jornadas CLAUSURA RED Envejecimiento (2016) “Funcionalización de nanopartículas de sílice mesoporosa con proteínas para su aplicación en vectorización activa y activación del sistema immune” **S. Montalvo-Quirós**, M. Vallet-Regí, J.L. Luque-García, B. González. Comunicación oral.
- EuChem (2016) “Hybrid Nanosystems for new tuberculosis vaccines: immune system activation” **S. Montalvo-Quirós**, M. Vallet-Regí, J.L. Luque-García, B. González. Comunicación tipo póster.
- XXI Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (2017) “Cancer cell targeting and specific delivery of silver nanoparticles by functionalized mesoporous silica-based nanocarriers” **S. Montalvo-Quirós**, M. Vallet-Regí, B. González, J.L. Luque-García. Comunicación oral. Premio “mejor comunicación oral”.
- EUROPEAN CONGRESS AND EXHIBITION ON ADVANCED MATERIALS AND PROCESSES, EUROMAT (2017) “Silver Nanoparticles Supported on Mesoporous Silica Nanoparticles Functionalized with Proteins: Hybrid Nanosystems against Tuberculosis” **Sandra Montalvo-Quirós**, María Vallet-Regí, Rafael Prados-Rosales, Jose L. Luque-García, **Blanca González**. Comunicación oral.

Artículos derivados enviados o en preparación:

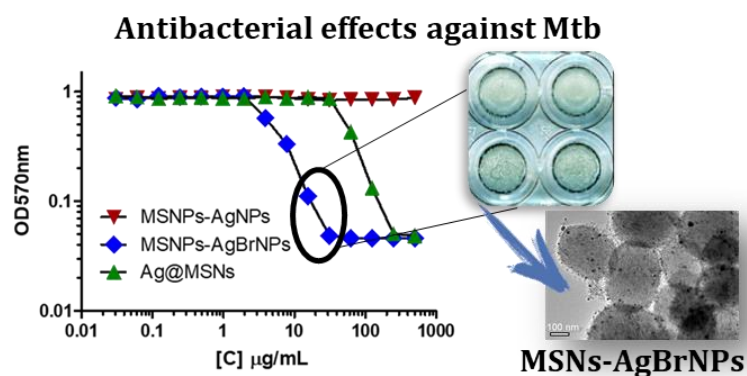
- Sandra Montalvo-Quirós, Jose L. Luque-García. Elucidating the toxicity mechanisms associated to  $\text{TiO}_2$  nanoparticles exposure by SILAC-based quantitative proteomics.



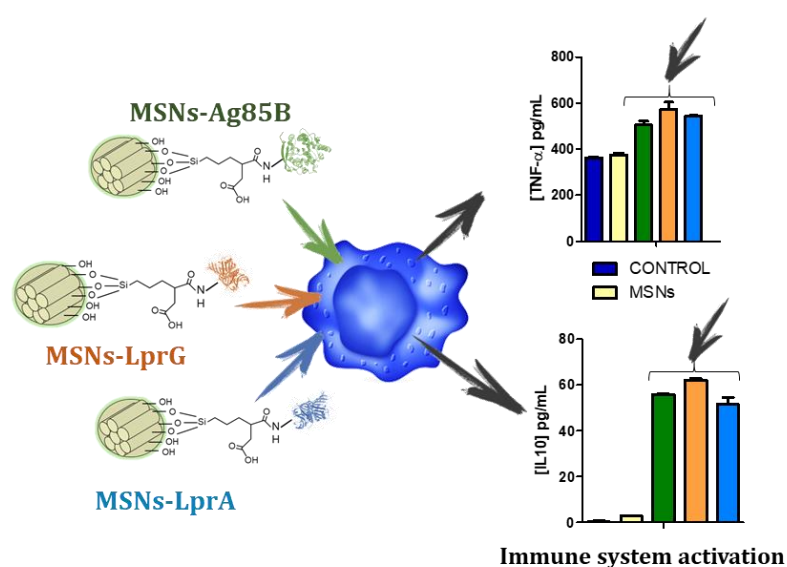
- Sandra Montalvo-Quirós, Guillermo Aragonese-Cazorla, Laura García-Alcalde, María Vallet-Regí, Blanca González, Jose L. Luque-García. Cancer cell targeting and therapeutic delivery of silver nanoparticles by transferrin decorated mesoporous silica nanocarriers. Evaluation of the biomolecular mechanisms involved by quantitative proteomics.



- Sandra Montalvo-Quirós, Sergio Gómez-Graña, Ainhoa Palacios, María Vallet-Regí, Rafael C. Prados-Rosales, Blanca González, Jose L. Luque-García. Silver containing mesoporous silica nanoparticles as novel antibacterial agents against *Mycobacterium tuberculosis*.



- Sandra Montalvo-Quirós, María Vallet-Regí, Rafael C. Prados-Rosales, Blanca González, Jose L. Luque-García. Mesoporous silica nanoparticles decorated with immunomodulatory proteins as novel potential vaccine against tuberculosis.





El auge de la nanomedicina en los últimos años ha supuesto un gran avance en la monitorización, diagnóstico y control de los sistemas biológicos, y ha contribuido al desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento y la prevención de diversas enfermedades. Por ello, la presente Tesis Doctoral se centra en la síntesis y desarrollo de nuevos nanosistemas basados en nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs) para su aplicación en dos enfermedades de gran prevalencia, como son la tuberculosis y el cáncer. Los nanosistemas obtenidos se evalúan frente a líneas bacterianas o celulares adecuadas obteniendo resultados muy prometedores. La combinación de técnicas (bio)analíticas y de proteómica cuantitativa permite conocer en mayor detalle los mecanismos moleculares de acción de los diversos nanosistemas.

**"Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha llevado a alcanzar mis metas: mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad "**

**Louis Pasteur**